

Der Einfluß
von Allopurinol, Cyclophosphamid
und 6-Methylmercaptapurinribosid
auf die Bildung und Ausscheidung
von Purinkörpern beim Hühnerembryo

Stefan Kraußer

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0083

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von

Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Der Einfluß von Allopurinol, Cyclophosphamid und 6-Methyl-
mercaptapurinribosid auf die Bildung und Ausscheidung von
Purinkörpern beim Hühnerembryo

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stefan Krauß
aus
Winkelhaid

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.Allgemeiner Teil	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Purinstoffwechsel	2
1.3. Regulation des Purinstoffwechsels	4
1.4. Harnsäureausscheidung des Vogelembryos	9
1.5. Allopurinol, Cyclophosphamid und 6-Methyl- mercaptapurinribosid (6-MMPR)	10
1.6. Zielsetzung	15
2.Eigene Untersuchungen	16
2.1. Material	16
2.2. Methoden	16
2.2.1. Behandlung der Embryonen	16
2.2.2. Herstellung des Homogenats	17
2.2.3. Aktivitätsbestimmung der Xanthindehydrogenase (XDH) (EC 1.2.1.37)	17
2.2.4. Aktivitätsbestimmung der Glutaminsynthetase (GS) (EC 6.3.1.2)	18
2.2.5. Aktivitätsbestimmung der Amidophosphoribosyl- transferase (PRPP-TA) (EC 2.4.2.14)	19
2.2.6. Bestimmung der Harnsäure mit Urica-quant-Test- Combination (enzymatisch)	20
2.2.7. Bestimmung von Hypoxanthin, Xanthin und Inosin mit Hochdruckflüssigkeitchromatographie (HPLC)	20
2.2.8. Bestimmung des Volumens der Allantois- flüssigkeit	22
2.2.9. Kreatininbestimmung	23
2.2.10. Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode	23
2.2.11. Statistische Berechnungen	24
3.Ergebnisse	25
4.Diskussion	48
5.Zusammenfassung - Summary	54
6.Literaturverzeichnis	56

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung

Ähnlich wie Tumore zeichnet sich auch embryonales Gewebe durch rasches Wachstum aus. Die Grundlage hierfür bildet ein intensivierter Nucleinsäuren-Stoffwechsel, der sich stimulierend auf die Proteinsynthese auswirkt. Daraus resultiert letztlich eine positive Stickstoffbilanz: Der Organismus nimmt mehr Stickstoff auf, als er insgesamt wieder ausscheidet.

Beim Säuger wird der überflüssige Aminostickstoff überwiegend in Harnstoff umgewandelt. Beim Vogel ist die Ausscheidung von Harnstoff auf 1 - 10 % des Urinstickstoffs beschränkt. Der Großteil des harnpflichtigen Stickstoffs wird in Form von Harnsäure ausgeschieden (TASAKI and OKUMURA, 1964; OKUMURA and TASAKI, 1968; MC NABB and MC NABB, 1975). Dies setzt die frühzeitige Entwicklung einer vielstufigen Reaktionsfolge, die zur Bildung des Puringerüsts und der daran anschließenden Umwandlung zur Harnsäure führt, voraus.

Abgesehen von der Funktion, harnpflichtige Aminogruppen der Harnsäurebildung zuzuführen, steht die Purinsynthese auch im Dienste des Nucleinsäuren-Stoffwechsels. Über ihn werden wichtige Grundbausteine der Nucleinsäuren gebildet. Umgekehrt werden Abbauprodukte der Nucleinsäuren und Purinnucleotide, ähnlich wie die Aminogruppen, in Form von Harnsäure ausgeschieden.

Ogleich die Reaktionsfolgen dieser Prozesse weitgehend geklärt sind, ist das Wissen über ihre Regulation nicht befriedigend. Dies gilt insbesondere für die Regulationsmöglichkeiten in einem sich entwickelnden Organismus. Die Ursache hierfür mag darin begründet sein, daß sich derartige Studien am Säugerembryo besonders schwierig gestalten. Dem-

gegenüber stellt der Vogelembryo ein wesentlich einfacheres Modell dar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welche Auswirkungen Eingriffe in den Purinstoffwechsel beim heranwachsenden Hühnerembryo zur Folge haben.

1.2. Purinstoffwechsel

Mit wenigen Ausnahmen besitzt jede lebende Zelle die Fähigkeit, die Purinnucleotide selbst zu synthetisieren. Dies schließt nicht aus, daß auch Purinkörper aus dem Extrazellulärraum oder abgebaute Nucleotide dazu verwendet werden.

Die Zelle baut den Purinring nach einem komplizierten Reaktionsmechanismus auf. Die entscheidenden Kenntnisse darüber gehen auf Versuche am Vogel zurück.

Für die Purinbiosynthese fehlte lange Zeit eine plausible Reaktionsfolge. Der Mechanismus wurde erst verständlich, als klar wurde, daß entgegen den Erwartungen nicht zuerst der Purinring synthetisiert und danach die N-glykosidische Bindung zur Ribose geknüpft wird, sondern daß zunächst ein acyclisches Ribonucleotid aufgebaut wird, das dann durch Ringschluß ein Purinnucleotid ergibt.

Die "de novo" Synthese verwendet Glucose für die Bildung der Ribose, Aminosäuren, Formaldehyd gebunden an Tetrahydrofolsäure, Kohlendioxid, Wasser und anorganisches Phosphat. Schließlich erfordert die Synthese einen hohen Energieaufwand.

Die Synthese geht von D-Ribose-5-Phosphat aus, welches im Pentosephosphat-Zyklus gebildet und mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch die Ribosephosphatpyrophosphokinase zu 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) umgesetzt wird. Dies ist ein sehr unspezifischer Schritt, weil das PRPP auch für andere Reaktionen, insbesondere den "Salvage Pathway" oder für die Synthese der Pyrimidinbasen benötigt wird.

Der nächste Schritt dagegen, die Bildung von 5-Phosphoribosyl-1-amin aus PRPP und Glutamin durch die α -5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat Amidotransferase (PRPP-TA) ist spezifisch und zudem nur schwer umkehrbar. Er stellt auch eine ungewöhnliche Reaktion dar, da eine aus dem β - und γ -Phosphat des ATP bestehende Pyrophosphatgruppe übertragen wird.

Im nachfolgenden Schritt wird Glycin in den entstehenden Purinkörper eingebaut. Durch weitere Anlagerung von Amino-, Formyl- und Kohlendioxidgruppen wird der Purinkörper bis zur Inosinsäure (IMP) vervollständigt.

Ab dem IMP läuft die Synthese der Purinnucleotide aus Adenin und Guanin getrennt weiter. Adenosin-5'-monophosphat (AMP) wird durch Substitution am Kohlenstoffatom 6 gebildet, während für die Bildung des Guanosin-5'-monophosphat (GMP) zunächst das Kohlenstoffatom 2 des Purinringes oxidiert und dann erst der Sauerstoff durch eine Aminogruppe ersetzt wird.

Die einzelnen Nucleotide, Nucleoside und Purinbasen verbindet ein weitvernetztes Enzymsystem. Damit wird gewährleistet, daß in jeder Stoffwechsellage eine ausreichende Versorgung mit dieser biologisch äußerst wichtigen Stoffklasse aufrecht erhalten werden kann. Vor allem ist damit eine gewisse Unabhängigkeit von der Bildungsgeschwindigkeit des Puringerüstes garantiert. Besonders wirkungsvoll kommt dies am Beispiel des sog. "Salvage Pathway" zum Ausdruck. Die bis zu den Purinbasen Adenin, Guanin und Hypoxanthin abgebauten Purine können über eine Phosphoribosyltransferase wieder zu den entsprechenden Nucleotiden aufgebaut und dadurch vor Ausscheidung als Harnsäure bewahrt werden (BAKER and BENNETT, 1964; SALSER and BALIS, 1965; MURRAY, 1966; LANGEN, 1968). Diese Möglichkeit der Reutilisation ist insbesondere für den Erythrozyten und das Zentralnervensystem, die über keinen ausgeprägten Biosyntheseweg der Purine verfügen, wichtig (FONTANELLE and HENDERSON, 1969).

Der Abbau der Purine verläuft - ausgehend von Adenosin, Inosin und Guanosin - über Desaminierung, Abspaltung des D-Ribose-5-phosphates und Oxidation zur Harnsäure. Die Ausscheidung des Purinringes als Harnsäure, wie es bei Menschen, Vögeln, Reptilien und Menschenaffen der Fall ist, bedeutet gleichzeitig den Verlust der Energie, die beim Aufbau des Puringerüsts erforderlich war. Bei vielen Lebewesen wird der Purinring vor der Ausscheidung weiter abgebaut, bei niederen Lebensformen sogar bis zu NH_3 und CO_2 .

1.3. Regulation des Purinstoffwechsels

Die Zelle setzt vielfältige Regulationsmechanismen im Auf- und Abbau der Purine ein, um dem jeweiligen Bedarf der verschiedenen Purinnucleotide gerecht zu werden. Zudem gibt es ausgeprägte tierartliche Unterschiede in diesem Regulationsgeschehen, obgleich der Reaktionsweg der Purin- und Harnsäurebildung im gesamten Tierreich nach dem gleichen Schema abläuft.

Besonders auffallend sind die Unterschiede zwischen Säuger und Vogel. Das Konzept, das diesen Unterschieden zugrunde liegt, wird verständlich, wenn man bedenkt, daß beim Säuger der Harnstoffzyklus bei der Entgiftung und Ausscheidung der anfallenden Aminoverbindungen im Vordergrund steht und der Einbau in das Puringerüst nur von der untergeordneten Bedeutung ist, während beim Vogel die Purinbildung und dessen Überführung in die Harnsäure als der bestimmende Stoffwechselweg anzusehen ist. Ist im ersten Falle die Fixierung der Aminogruppe auf der Stufe der Carbamylphosphat-Synthetase bereits ein integrierter Bestandteil des Harnstoffzyklus, so vollzieht sich im zweiten Falle die Detoxifizierung des Aminostickstoff in einer quasi Vorreaktion zur Purinbiosynthese, nämlich bei der Überführung des Glutamates zum Glutamin.

Die Bildung des Glutamins erfolgt über die Glutamin-Synthe-

tase (GS), ein ubiquitäres Enzym, das im Verlauf der Evolution nachhaltige Modifizierungen erfahren hat. In *E. coli* - dort ist es besonders intensiv untersucht worden - und anderen prokaryontischen Organismen (GEBHARDT and MECKE, 1984) wird ihre Aktivität über ein komplexes Kontrollsystem reguliert, das von der Repression und Derepression des Enzymproteins, Feedback-Hemmung durch metabolische Effektoren bis zu einer durch Metaboliten kontrollierten Interconvertierung reicht.

Beim Säuger gibt es bislang keine Hinweise auf einen Interconvertierungsmechanismus, der dem bei den Prokaryonten entspricht, obgleich auch hier ein breites Spektrum von stimulierenden und inaktivierenden Agenzien bekannt ist: Hormone, Metaboliten, anorganische Ionen (DEUEL et al., 1978; GEBHARDT and MECKE, 1984).

Die im Vergleich zum Harnstoffzyklus untergeordnete Bedeutung der GS bei der Fixierung des anfallenden Aminostickstoffs geht aus der Verteilung der beiden Reaktionswege in der Leber, der in diesem Zusammenhang eine zentrale Bedeutung zukommt, hervor. Während nämlich der Harnstoffzyklus sich auf den periportalen und den äußeren Bereich der perivenösen Region erstreckt, bleibt die GS auf einen kleinen Bezirk im perivenösen Leberabschnitt lokalisiert (GEBHARDT and MECKE, 1984). Damit sind ca. 90 % des Leberparenchyms an der Harnstoffsynthese beteiligt. Zudem zeigen Befunde aus der Literatur (GEBHARDT and MECKE, 1984), daß bei toxischen Eingriffen die beiden Enzymsysteme in unterschiedlicher Weise betroffen sind. Schließlich wird die hormonelle Aktivierung beider Stoffwechselwege von unterschiedlichen Hormongruppen gesteuert: Während bei der GS das Wachstumshormon und die Schilddrüsenhormone ihre Aktivität ansteigen lassen, löst im Falle des Harnstoffzyklus Glucagon eine stimulierende Wirkung aus. In beiden Fällen wird allerdings den Glucocorticoiden ein permissiver Effekt zugeschrieben (GEBHARDT and MECKE, 1984).



Aufgrund dieser Befunde muß man davon ausgehen, daß die Bindung von Aminogruppen bei beiden Stoffwechselwegen unterschiedlichen Zielen dient. Das in diesem Zusammenhang entwickelte Konzept (GEBHARDT and MECKE, 1984: Glutaminzyklus) geht davon aus, daß im sogenannten "Harnstoff-Kompartiment" Glutamin aus dem Kreislauf angeliefert wird, das dann entweder über die Glutaminase dem Harnstoffzyklus zugeführt wird, oder zum Aufbau der Purinnucleotide oder Proteine eingesetzt wird. Im "Glutamin-Synthese-Kompartiment" gebildetes Glutamin hingegen wird an den Kreislauf abgegeben. Demnach würde beim Säuger die Glutaminsynthese der Leber nicht in erster Linie im Dienste der Purinsynthese stehen.

Demgegenüber besteht kein Zweifel, daß beim Vogel der Amino-stickstoff über die Bildung des Glutamins der Purin- und schließlich der Harnsäurebildung zugeführt wird (BLOOMFIELD et al., 1969). Darauf weisen auch die Befunde hin, daß bei Prozessen, bei denen erhöhte harnpflichtige Aminogruppen anfallen, z. B. bei Diäten mit hohem Proteingehalt oder nach längerem Fasten, die Aktivität der GS ansteigt (KATUNUMA et al., 1970; BARRATT et al., 1974; CAMPBELL and VORHABEN, 1976), während beim Säuger derartige Stoffwechselsituationen sich in einer Zunahme der Glutaminase-Aktivität äußern (GEBHARDT and MECKE, 1984).

Es gibt beim Vogel allerdings bis heute keine Werte über die Verteilung der GS in der Leber. Bekannt ist aber (KATUNUMA et al., 1970; VORHABEN and CAMPBELL, 1972; VORHABEN and CAMPBELL, 1977; GEBHARDT and MECKE, 1984), daß die Aktivität der GS in der Vogelleber die der Säugerleber um ein Vielfaches übersteigt. Auf der anderen Seite ist die Aktivität der Glutaminase, die die Spaltung des Glutamins katalysiert, beim Säuger im Vergleich zum Vogel deutlich höher (KATUNUMA et al., 1970). Dies bekräftigt die Vorstellung, wonach in der Leber beim Säuger die Spaltung und beim Vogel die Bildung des Glutamins im Vordergrund steht. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß beim Vogel die GS überwiegend in den Mitochondrien und beim Säuger im Cytoplasma lokalisiert

ist (VORHABEN and CAMPBELL, 1972; VORHABEN and CAMPBELL, 1977; GEBHARDT and MECKE, 1984).

Schließlich ist zu vermerken, daß die aufgezeigten Unterschiede in der Funktion der GS durch die andersgearteten Stoffwechsellagen bei Vogel und Säuger und nicht in Strukturunterschieden des Enzyms begründet sind (SEYANA et al., 1972).

Wie bereits oben ausgeführt wurde, wird der Schritt der PRPP-TA als die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion in der Purinsynthese angesehen. Das Enzym hat eine tetramere Struktur und besitzt 10 - 12 Fe-Atome (HARTMANN, 1963; ROWE and WYNGAARDEN, 1968). Für ihre regulierende Eigenschaft ist die allosterische Hemmbarkeit durch Mononucleotide, die als Basen Adenosin, Inosin und Guanosin enthalten, von Wichtigkeit (WYNGAARDEN and ASHTON, 1959; CASKEY et al., 1964; MC COLLISTER et al., 1964; HENDERSON and KHOO, 1965; NIERLICH and MAGASANIK, 1965). Bezeichnend für diese Substanzen ist es, daß ihre Hemmwirkungen additiv sind. Dies weist auf verschiedene Bindungsstellen der einzelnen Nucleotide hin. Mit dieser Hemmung wird letztlich eine Abnahme der Purinsynthese bei ausreichender Purinnucleotidkonzentration erreicht. Umgekehrt wird eine zunehmende Unempfindlichkeit des Enzyms gegenüber diesen Rückkopplungsmetaboliten als potentielle Ursache einer Hyperuricämie gesehen (RUNDLES, 1985). Auffallend ist, daß diese Rückkopplungshemmung beim Vogel allgemein schwächer ausgeprägt ist und in der Taubenleber offensichtlich überhaupt nicht wirksam ist (KATUNUMA et al., 1970; WYNGAARDEN and HOLMES, 1977).

Eine weitere regulierende Größe auf dieser Stufe ist die PRPP-Konzentration. Mit zunehmender Konzentration erhöht sich die Aktivität der PRPP-TA (RUNDLES, 1985). Diese Eigenschaft kann unter Umständen die Ausbildung einer Hyperuricämie begünstigen.

Eine regulierende Kapazität in der Reaktionssequenz der

Harnsäurebildung kommt schließlich auch der Xanthindehydrogenase (XDH) zu. Sie katalysiert nicht nur die Harnsäurebildung aus Xanthin, sie ist auch an der Umsetzung von Hypoxanthin zu Xanthin beteiligt. Im Gegensatz zum Vogel werden beim Säuger diese Schritte von einer Oxidase (DE RENZO, 1956) katalysiert, die aus einer Dehydrogenase übergeführt werden kann (DELLA CORTE and STIRPE, 1968; STIRPE and DELLA CORTE, 1969; WAUD and RAJAGOPALAN, 1976). Mit dieser Überführung aus der Dehydrogenase-Form geht die Hemmbarkeit durch NADH verloren (DELLA CORTE and STIRPE, 1970; DELLA CORTE and STIRPE, 1972; KAMINSKI and JEZEWSKA, 1981). Obgleich beide Formen weitgehend die gleichen Eigenschaften aufweisen, gibt es dennoch Hinweise auf unterschiedliche Verhaltensweisen.

So führt beim Vogel proteinreiche Ernährung, ähnlich wie Futterentzug, zu einer Steigerung der XDH-Aktivität, während beim Säuger die Xanthinoxidase darauf nicht reagiert (BIEN et al., 1953; STIRPE and DELLA CORTE, 1965; WASLIEN et al., 1968; SCHOLZ and FEATHERSTON, 1968; FEATHERSTON and SCHOLZ, 1968; BOWERING et al., 1969; LEE and FISHER, 1971; LEE et al., 1973; WOODWARD et al., 1975; FISHER et al., 1976). In diesem Befund kommt, ähnlich wie es auch schon bei der GS der Fall war, die Tatsache zum Ausdruck, daß die Ausscheidung des Aminostickstoffs beim Vogel über den Purinstoffwechsel erfolgt. Proteinmangel oder Protein schlechter Qualität schließlich führt beim Säuger zum Aktivitätsabfall der Xanthinoxidase (LITWACK et al., 1950; YOUNATHAN et al., 1956; VAN PILSUM et al., 1957; ROWE and WYNGAARDEN, 1966; GERSHOFF and ELVEHJEM, 1971). Dieser Effekt kommt möglicherweise über die Abnahme des Enzymproteins zustande.

Bekannt ist eine Regulierung der XDH durch Metaboliten aus dem Purinstoffwechsel. So wird das Enzym durch Inosin und Adenin aktiviert, nicht jedoch durch Xanthin, Xanthosin, Guanin, Guanosin und Adenosin (STIRPE and DELLA CORTE, 1965; DELLA CORTE and STIRPE, 1966; DELLA CORTE and STIRPE, 1967; WOODWARD et al., 1972; LEE et al., 1973). Ein Konzept, das

diese Befunde befriedigend erklärt, existiert jedoch bis heute nicht.

1.4. Harnsäureausscheidung beim Vogelembryo

Stickstoffabfälle werden beim Vogelembryo über die Niere in die Allantoisflüssigkeit ausgeschieden. Diese bildet sich beim Hühnerembryo vom 3. - 4. Tag an aus, erreicht um den 13. Tag ihr größtes Volumen und nimmt von da an gegen den Schlupf zu wieder ab (PATTEN, 1948; ROMANOFF, 1967).

In dem Muster der ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen vermutete Needham die Wiedergabe des evolutionären Weges des Vogels (NEEDHAM, 1926a,b; NEEDHAM, 1931). Seinen Untersuchungen zu Folge steht am Anfang der Embryogenese die Ammoniakausscheidung im Vordergrund, der eine Phase erhöhter Harnstoffausscheidung folgt, während die Harnsäureausscheidung sich erst daran anschließt. Spätere Untersuchungen konnten diesen Befund nicht bestätigen. Inzwischen weiß man, daß Ammoniak und Harnstoff annähernd zur gleichen Zeit gebildet und ausgeschieden werden (FREEMAN and VINCE, 1974). Außerdem konnte bis heute beim Vogel kein vollständiger Harnstoffzyklus nachgewiesen werden (BLOOMFIELD et al., 1969). Es wird daher angenommen, daß der Harnstoff aus Zwischenstufen und nicht aus den Ausgangsverbindungen Ammoniak und Carbamylphosphat entsteht.

Das Hauptausscheidungsprodukt stellt jedoch die Harnsäure dar. Sie übersteigt um den 12. Tag der Inkubation das Löslichkeitsprodukt, so daß sie als leichte Trübung ausfällt. Die gesättigte Lösung entsteht dadurch, daß die ausgeschiedene Harnsäuremenge ansteigt, gleichzeitig um den 13. Tag der Inkubation die Allantoisflüssigkeit wieder abnimmt (ROMANOFF, 1967). Diese Abnahme der Allantoisflüssigkeit wird offensichtlich durch den Verlust von Na^+ und Cl^- -Ionen begünstigt. Hierin wird ein Mechanismus zur Konservierung von Flüssigkeit, die zur osmolaren Regulation erforder-

derlich ist, gesehen. Zu diesem Vorgang trägt möglicherweise auch die Ausfällung der Harnsäure bei. Da die Harnsäurefällung zusammen mit gebundenen Kationen erfolgt, ist sie mit einem besonders hohen Verlust osmotisch aktiver Substanzen verbunden (LONSDALE and SUTOR, 1971; MC NABB et al., 1973).

Für die Bildung der Harnsäure in der pränatalen Phase kommen unterschiedliche Organe in Frage. Bereits ab dem fünften Tag der Entwicklung konnte die Bildung von Harnsäure aus Xanthin im Mesonephros nachgewiesen werden (CHAUBE, 1962; CROISILLE, 1965). Während der Inkubation steigt die XDH in der Niere auf eine beträchtliche Aktivität an und um den 12. - 14. Tag soll schließlich eine relativ hohe Aktivität der XDH sich in der Leber einstellen, die gegen den Schlupf zu auf niedrigere Werte abfällt (BUTROS and KHALIDI, 1966). Dieser Befund konnte aber nicht bestätigt werden (MORGAN, 1930; KATO, 1960; CROISILLE, 1963; STRITTMATTER, 1965). Im Pankreas und im Duodenum liegen während der Bebrütung nur geringe Aktivitäten der XDH vor. Eine beträchtliche XDH-Aktivität wurde im Dottersack nachgewiesen (MORGAN, 1930). Eine deutliche Steigerung der XDH-Aktivität ist um die Zeit des Schlupfes in Leber, Niere, Pankreas und Duodenum zu beobachten (MORGAN, 1930; KATO, 1960; CROISILLE, 1963; STRITTMATTER, 1965; FISHER, 1966; FISHER et al., 1967). Allerdings läßt sich im Gegensatz zur Niere die XDH in der Leber durch Substanzen wie Thioharnstoff, Cycloheximid und Dexamethason schon pränatal aktivieren (PRUY, 1982; WITTMANN and PRUY, 1983; WITTMANN et al., 1986).

1.5. Allopurinol, Cyclophosphamid und 6-Methylmercaptapurin-ribosid (6-MMPR)

Im Verlauf der Arbeit wurde der Einfluß von Allopurinol, Cyclophosphamid und 6-MMPR auf den embryonalen Purinstoffwechsel untersucht. Im folgenden soll daher auf die Eigenschaften dieser Substanzen näher eingegangen werden.

a. Allopurinol:

Allopurinol ist ein Antagonist des Hypoxanthins und hemmt als solcher die Xanthinoxidase bzw. XDH. Auf diesen Effekt begründet sich auch sein Einsatz bei einigen Gichtformen. Allopurinol wurde zwar schon um 1950 (LORZ and HITCHINGS, 1950) synthetisiert und seine Fähigkeit, die Xanthinoxidase zu hemmen, untersucht. Zum praktischen Einsatz kam es aber erst zwölf Jahre später (ELION et al., 1962). Es wurde zunächst in Kombination mit 6-Mercaptopurin verabreicht, um dessen Abbau über die Xanthinoxidase zu verhindern. Dies wurde auch tatsächlich erreicht und damit seine Toxizität bzw. seine antitumoröse Wirksamkeit gesteigert. Es bestand also die Möglichkeit, die eingesetzte Menge an 6-Mercaptopurin durch Kombination mit Allopurinol zu verringern, ohne die therapeutische Wirksamkeit herabzusetzen (RUNDLES, 1985). Nach den ersten Einsätzen bei Patienten mit chronisch granulocytärer Leucämie (HITCHINGS, 1963) wurde es auch bei primärer Gicht, bei Hyperuricämie, Urolithiasis und Nephropathien verwendet (RUNDLES et al., 1963).

Allopurinol wird im allgemeinen sehr gut vertragen. Jedoch ein kleiner Prozentsatz der Patienten reagiert mit Fieber und juckendem Hautausschlag, vergleichbar mit allergischen Beschwerden. Auch Gichtanfälle zu Beginn der Therapie sind möglich (KUSCHINSKY und LÖLLMANN, 1981).

Allopurinol wird vom Verdauungstrakt gut resorbiert und innerhalb der ersten vier bis fünf Stunden im Urin wieder ausgeschieden. Im Organismus wird es schnell durch die Xanthinoxidase in 4,6-Dihydroxy-(3,4 d)pyrazolopyrimidin (Oxypurinol) umgewandelt. Oxypurinol ist ebenfalls ein potenter Hemmer der Xanthinoxidase, wird jedoch bedeutend langsamer ausgeschieden als Allopurinol, deshalb wird die Dosis bei Patienten mit verschlechterter renaler Funktion reduziert.

Die Hemmung der Harnsäurebildung nach Gaben von Allopurinol führt in der Regel zu einer verstärkten Ausscheidung von

Xanthin und Hypoxanthin, jedoch wird dabei die verringerte Harnsäureausscheidung nicht gänzlich kompensiert (RUNDLES, 1985). Dies ist z. T. darauf zurückzuführen, daß die genannten Purine über den "Salvage Pathway" dem Nucleotidstoffwechsel zurückgeführt werden (POMALES et al., 1963; POMALES et al., 1965). Lediglich dann, wenn die Aktivität der dafür verantwortlichen Phosphoribosyl-Transferase nicht ausgebildet bzw. reduziert ist, was beim Lesch-Nyhan Syndrom des Menschen der Fall ist, ist die Gesamtpurinausscheidung nicht reduziert. In diesem Fall ist Gefahr der Bildung von Xanthinsteinen in der Niere besonders groß (HITCHINGS, 1966; (GREENE et al., 1969; BAND et al., 1970; WYNGAARDEN, 1970).

Bei Hunden mit hämorrhagischem Schock führte die Anwendung von Allopurinol zu einer Steigerung der Überlebensrate, zu einer Verbesserung der posttransplantären Nierenfunktion und der Überlebensdauer der Transplantate (MC CORD, 1985). Es wird vermutet, daß dies auf die Rückgewinnung bestimmter Purinkörper über den "Salvage Pathway" zurückzuführen ist. Auch eine Verhinderung der Superoxidbildung im Gewebe bei der Normalisierung der Sauerstoffversorgung ist unter diesen Bedingungen nicht auszuschließen.

Theoretisch ist beim Allopurinol-Einsatz auch mit einer Zunahme der PRPP-Konzentration zu rechnen, wenn sich über den "Salvage Pathway" Nucleotide anreichern, die hemmend auf die PRPP-TA einwirken. Tatsächlich konnte ein derartiger Effekt in Erythrozyten aufgezeigt werden (FOX et al., 1970; FOX and KELLEY, 1971).

Überraschend ist schließlich, daß durch Verfütterung von Allopurinol an Küken die XDH-Aktivität erhöht wurde. Dieser Effekt war vergleichbar mit dem, der sich nach Gaben von Adenin oder nach hohen Proteindiäten einstellte (LEE et al., 1973).

b. Cyclophosphamid:

Seit Jahrzehnten werden in der Medizin erfolgreich Cytostatika gegen Neoplasien eingesetzt. Die Wirkungsweise dieser Substanzen ist sehr unterschiedlich und teilweise auch noch unbekannt. Man weiß, daß sie letztendlich alle über die Beeinflussung des Nucleinsäuren-Stoffwechsel wirken. Der Nachteil dieser Stoffe ist, daß sie nicht selektiv auf Tumore, sondern allgemein auf stoffwechsel- bzw. mitotisch aktive Zellen wirken. Deshalb sind die Nebenwirkungen entsprechend vielseitig. Ihr Einsatz ist daher auch auf sehr eng begrenzte Indikationen beschränkt.

Cyclophosphamid wird mit gutem Erfolg zur Therapie chronischer lymphatischer und myeloischer Leucämien, Lymphogranulomatose, Lymphosarkom, gegen Tumore mit disseminiertem Wachstum (Ovarial-, Mamma-, Bronchialtumor), zu Recidiv- und Metastasenprophylaxe (SCHUNACK et al., 1981) oder zur Immunsuppression (LINNA et al., 1972; TURK and POULTER, 1972; ESKOLA and TOIVANEN, 1974; BOTZENHARDT and LEMMEL, 1976), auch bei Transplantationen in der Humanmedizin (STARZL et al., 1971) eingesetzt. Es wirkt dabei äußerst unspezifisch, indem es grundsätzlich nucleophile Stoffe alkyliert. Durch die Alkylierung der DNA kommt es zu einer Vernetzung (cross linking) der DNA (SCHUNACK et al., 1981; WARING, 1981; FORTH et al., 1983). Dadurch wird die Transkription behindert. Dies hat zur Folge, daß mitotisch aktive Zellen am stärksten betroffen sind. Durch einen solch massiven Eingriff muß auch der Purinstoffwechsel in Mitleidenschaft gezogen werden.

Cyclophosphamid wirkt allerdings auch teratogen, und zwar in Konzentrationen, die niedriger sind als die, die in der medizinischen Therapeutik eingesetzt werden (ENGELS, 1970). Außerdem sind Alkylantien über einen längeren Zeitraum angewendet ihrerseits wiederum cancerogen. Weitere Nebenwirkungen sind Leucopenie, Alopezie, Nausea, Vomitus, hämorrhagische Cystitis bei oraler Cyclophosphamidapplikation, weni-

ger häufig Anämie, Fibrose der Harnblase, selten Nephrotoxität, milde Steatorrhoe, Malabsorption von Thiamin, latenter Folsäuremangel, geringe Elektrolytverschiebung und zeitweilige Azoospermie (MEYLER and HERXHEIMER, 1972).

c. 6-MMPR:

6-Mercaptopurin war eines der ersten angewandten Antimetaboliten und ist heute immer noch ein wichtiges Chemotherapeutikum der onkologischen Praxis. Seine Wirkung entfaltet sich dadurch, daß die Umwandlung von IMP zu AMP oder GMP oder die Bildung von β -5 Phosphoribosylamin durch PRPP-TA gehemmt wird (MC COLLISTER et al., 1962; BENNETT et al., 1963; BAKER and BENNETT, 1964; SALSER and BALIS, 1965; MURRAY, 1966; LANGEN, 1968). Dadurch nimmt entweder die Synthese des Puringerüstes ab oder es werden infolge der Hemmung der AMP und GMP-Bildung der Zelle wichtige Nucleotide entzogen. Dies führt letztlich zur Eindämmung der hohen mitotischen Aktivität von Tumorzellen. Dabei scheint die Hemmung der PRPP-TA im Vordergrund zu stehen. Dies kommt darin zum Ausdruck, daß in Geschwülsten, deren Wachstum in hohem Maße von der "de novo"-Purinsynthese abhängig ist, 6-Mercaptopurin wirksamer ist als in Tumoren, die die Fähigkeit besitzen, freie Purinbasen zu verwerten.

Um wirksam zu sein, muß 6-Mercaptopurin in das entsprechende Ribonucleotid überführt werden (LE PAGE and JONES, 1961). Diese Reaktion katalysiert die Inosin-5'-phosphat-pyrophosphorylase. Dies erklärt, warum 6-Mercaptopurin nicht wirksam ist, wenn dieses Enzym, wie es bei manchen Tumorzellen der Fall ist, fehlt. Ein besonders wirksamer Ribonucleotidmetabolit ist das 6-MMPR, ein Analog des Adenosins, das auch von der Adenosin-Kinase intrazellulär gebildet wird (BENNETT et al., 1965; ALLAN et al., 1966). Auffallend ist, daß Ribonucleoside auf die PRPP-TA der Taubenleber keine Wirkung entfalten (WYNGAARDEN and HOLMES, 1977). Therapeutisch werden die Purinanaloge vor allem bei akuten Leucämien,

Chorioncarcinom und Kinderleucämien eingesetzt (BURCHENAL et al., 1954; SCHUNACK et al., 1981).

Als Nebenwirkung sind sie, wie Cyclophosphamid, immunsuppressiv (HERROD et al., 1970; BOTZENHARDT and LEMMEL, 1976) und verursachen schwere Knochenmarksschädigungen durch Cytostase. Da die Xanthinoxidase in Tumorgewebe häufig erniedrigte Aktivität aufweist, läßt sich die Selektivität der Purinanloga gut durch verminderten Abbau im Tumor erklären (SCHUNACK et al., 1981).

1.6. Zielsetzung

Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, scheidet der Vogel in der pränatalen Phase eine beträchtliche Menge an Harnsäure aus. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, in welchem Umfang beim Hühnerembryo die Fähigkeit entwickelt ist, Bildung und Ausscheidung von Purinkörpern zu regulieren. Zu diesem Zwecke wurde einmal die Bildung der Harnsäure durch Hemmung der XDH mit Allopurinol unterdrückt, darüberhinaus wurde mit Cyclophosphamid eine Substanz eingesetzt, die im Nucleinsäurestoffwechsel ihre Wirkung entfaltet und schließlich wurde versucht mit Hilfe von 6-MMPR in den Purinaufbau einzugreifen.

Die Auswirkungen dieser Substanzen wurden anhand der Purinkörperausscheidung in die Allantois überprüft. Ergänzend hierzu wurden die Aktivitäten der GS, PRPP-TA und XDH, die an der Bildung des Puringerüsts bzw. der Harnsäure beteiligt sind, untersucht.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Material

Die Untersuchungen wurden an Hühnerembryonen der Rasse "Weißes Leghorn" und "Braunes Leghorn" durchgeführt. Die Bruteier stammten von Bayer. LSL Vermehrungsbetriebe, Gut Heinrichsruh, bzw. vom Geflügelhof Müller, Lohfeld.

Phosphoribosylpyrophosphat, Cyclophosphamid und 6-MMPR wurden von Sigma Chemicals bezogen, Allopurinol, Hypoxanthin und Trypanblau von Serva, Heidelberg. Von Boehringer, Mannheim, sind Adenosintriphosphat, Inosin, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, Glutamatdehydrogenase und die Urica-quant-Test-Combination; die anderen Reagentien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Behandlung der Embryonen

Cyclophosphamid und 6-MMPR wurden in 0,2 ml H₂O dest. gelöst und mit Einmalspritzen in die Luftkammer appliziert. Allopurinol wurde wegen der geringen Löslichkeit als Suspension in die Luftkammer verabreicht.

Vorversuche ergaben, daß die Applikation von 0,2 ml H₂O dest. in die Luftkammer keine Auswirkungen auf die Entwicklung des Embryos zur Folge hat. Deshalb konnte von einer Behandlung der Kontrollen mit H₂O abgesehen werden.

Allopurinol wurde zu Beginn der Inkubation verabreicht. Bei Cyclophosphamid und 6-MMPR führten zu diesem Zeitpunkt bereits relativ kleine Mengen zum Absterben der Embryonen. Darum wurde in der frühen Phase erst jeweils am 6., 8. und 10. Tag der Inkubation behandelt und 2 Tage später die

Untersuchungen durchgeführt. Für Untersuchungen der späten Embryonalphase wurden die Embryonen am 17. Tag behandelt und am 18., 19. und 20. Tag untersucht.

2.2.2. Herstellung des Homogenats

Die frisch entnommene Leber wurde mit 5-facher Menge Saccharose (0,25 mol/l) - EDTA (1 mmol/l) - Puffer (pH 7,0) gepottert (8 - 10 Schläge bei 1.200 U/min) und das Homogenat 15 min bei 15.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand wurden die Aktivität von XDH, GS und PRPP-TA bestimmt. Wie Vorversuche zeigten, ist unter den aufgezeigten Bedingungen die gesamte Aktivität der XDH und PRPP-TA in den Überständen enthalten. Im Niederschlag hingegen verblieb der mitochondriale Anteil der GS.

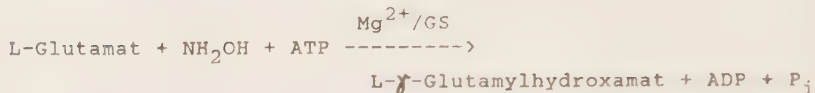
Zur Enzymbestimmung in der Niere wurde diese genauso aufbereitet wie die Leber. Bei der Dottersackmembran wurde vor dem homogenisieren der flüssige Dotter durch mehrmaliges waschen mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt.

2.2.3. Aktivitätsbestimmung der Xanthindehydrogenase (XDH) (EC 1.2.1.37)



In der temperierten Cuvette wurden 1 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,8), 0,15 ml KCN-Lösung (0,2 mmol/l), 0,15 ml NAD^+ -Lösung (8,2 mmol/l) und 0,1 bis 0,2 ml Überstand als Probe gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 0,15 ml Xanthinlösung (3,8 mmol/l) gestartet. Die Bildung von NADH wurde bei einer Wellenlänge von Hg 334 nm am Eppendorfphotometer gemessen, wobei man die NADH-Bildung vor Xanthinzugabe subtrahiert (MORELL, 1955a,b; SCHOLZ and FEATHERSTON, 1968).

2.2.4. Aktivitätsbestimmung der Glutaminsynthetase (GS) (EC 6.3.1.2)



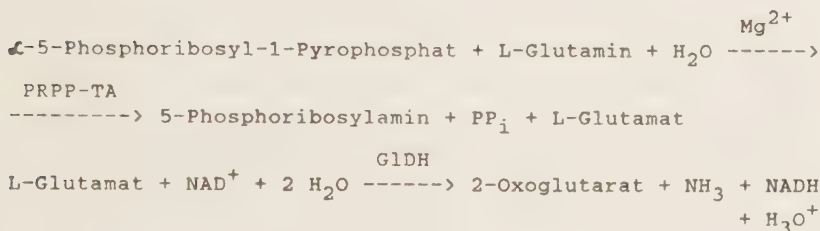
Anstelle von Ammoniumionen, dem "in vivo" Substrat der GS, werden Hydroxylammoniumionen verwendet. Die GS katalysiert die Bildung von L- γ -Glutamylhydroxamat, das mit FeCl_3 eine charakteristische Farbreaktion ergibt (LIPMANN and TUTTLE, 1945; ELLIOT, 1975; MEISTER, 1985).

Die Aktivität der GS wurde sowohl im Überstand des Homogenates als auch in dessen Niederschlag bestimmt. Die im Niederschlag enthaltene Aktivität stellt den mitochondrialen Anteil dar. Dieser wurde nach Resuspendierung des mitochondrialen Niederschlages im Phosphat-Puffer (70 mmol/l, pH 7,0) bestimmt.

Für die Aktivitätsmessung der GS wurde eine Stammlösung hergestellt, die in 10 ml Trisacetat-Puffer (80 mmol/l, pH 7,4) 55,6 mg Hydroxylammoniumchlorid, 98,6 mg Magnesiumsulfat, 176,5 mg Glutamat, 121,0 mg Adenosintriphosphat und 0,02 ml Mercaptoethanol enthielt.

Jeweils 0,4 ml der Lösung wurden mit 0,5 mg Kreatinkinase sowie 1,6 mg Kreatinphosphat als ATP-regenerierendes System und 0,05 ml Probe (Überstand bzw. Niederschlag) versetzt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit einer Lösung gestoppt, die aus gleichen Teilen FeCl_3 (10 % FeCl_3 in 0,1 molarer HCl), Trichloressigsäure (12 %) und HCl (3 mol/l) bestand. Anschließend wurde zentrifugiert (12.000 U/min) und die Extinktion des Überstandes gegen einen Leerwert, bei dem kein Glutamat eingesetzt wurde, bei λ 546 nm gemessen.

2.2.5. Aktivitätsbestimmung der Amidophosphoribosyl-transferase (PRPP-TA) (EC 2.4.2.14)



Die Bestimmung der PRPP-TA erfolgte indirekt über die Bestimmung des gebildeten Glutamats (WYNGAARDEN and ASHTON, 1959; LEWIS and HARTMAN, 1978; PRAJDA et al., 1979).

Für die Inkubation wurde folgendes Medium hergestellt:

α -5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (5 mmol/l)
 Glutamin (20 mmol/l)
 Magnesiumchlorid (15 mmol/l)
 Natriumfluorid (1 mmol/l) gelöst in
 Trisacetatpuffer (50 mmol/l, pH 7,2)

Je 1 ml des Inkubationsmediums (mit bzw. ohne PRPP) wurde in Reagenzgläsern mit 0,2 ml Probe (Überstand siehe 2.2.2.) eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Kochen im Wasserbad (6 min) gestoppt und anschließend in der Zentrifuge bei 12.000 U/min das denaturierte Protein abzentrifugiert.

Das gebildete Glutamat wurde durch Oxidation mit der Glutamatdehydrogenase bestimmt. Dabei wurde 1 ml Glycin-Hydrazin-Puffer (3,75 g Glycin + 5,5 ml Hydrazin ad 100 ml, pH 9,0) mit 0,5 ml Überstand und 0,1 ml 2 %iger NAD⁺-Lösung vermischt, und jeweils vor und 60 min nach Zugabe von 0,02 ml Glutamat-Dehydrogenase die Extinktion bei Hg 546 nm bestimmt. Von der Extinktionsänderung des Meßwertes wurde die des zugehörigen Leerwertes abgezogen (BERGMAYER et al., 1970).

2.2.6. Bestimmung der Harnsäure mit Urica-quant-Test-Combination (enzymatisch)

Bei dieser Methode wurde die Harnsäure durch das Enzym Uricase in Allantoin umgesetzt. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert Methanol durch Einwirkung der Katalase zu Formaldehyd, welches mit Acetylaceton und Ammoniak einen Farbstoff (3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin) bildet, dessen Zunahme bei Hg 405 nm photometrisch gemessen wurde.

Proben mit hoher Harnsäurekonzentration wurden entsprechend verdünnt.

2.2.7. Bestimmung von Hypoxanthin, Xanthin und Inosin mit Hochdruckflüssigkeitchromatographie (HPLC)

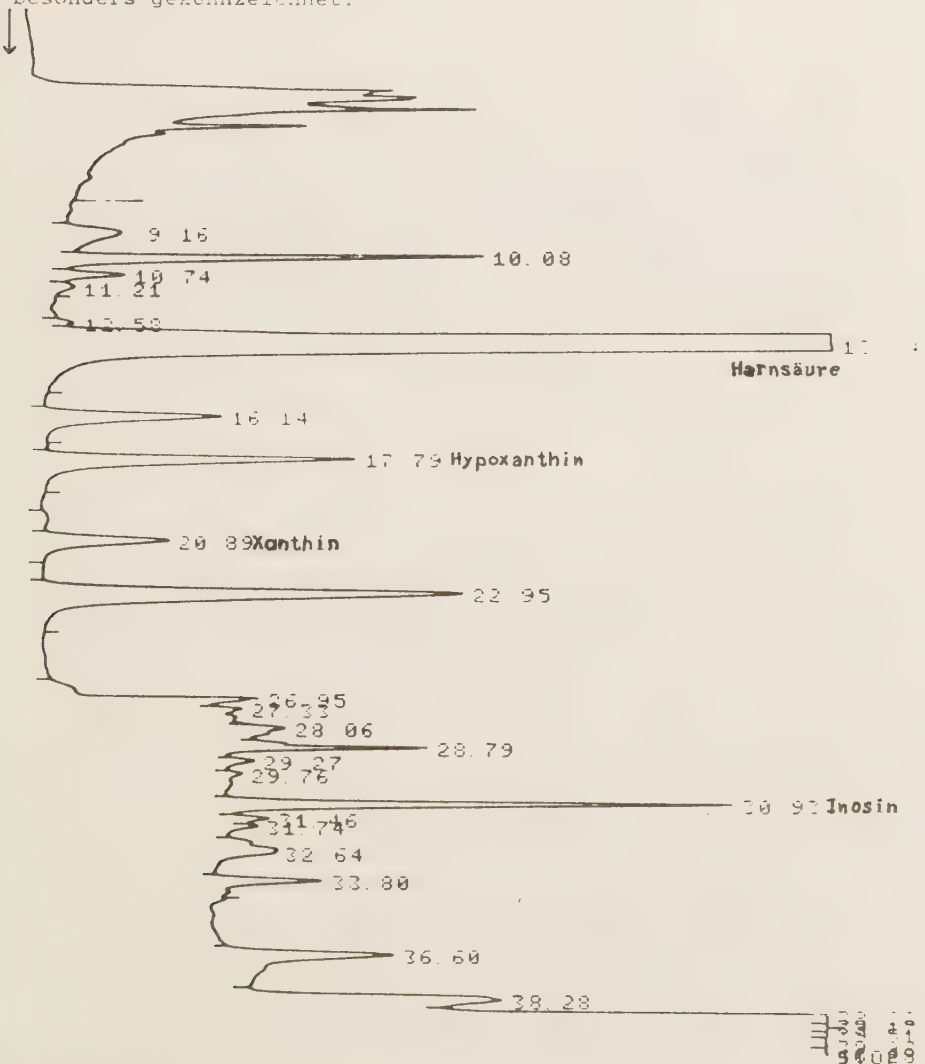
Die Analysen wurden mit einer HPLC-Anlage der Firma Waters durchgeführt. Das Wasser wurde in der Milliporeanlage gefiltert und anschließend entgast. Die Säule hatte einen Innendurchmesser von 4,6 mm und eine Länge von 50 cm (zwei Säulen von 25 cm hintereinander verschraubt) und war mit Spherisorb ODS II (Partikelgröße 0,005 mm) gefüllt (Reverse phase). Als Puffer wurde eine Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (10 mmol/l, pH 4,8) verwendet. Inosin wurde mit 10 % Methanol eluiert. Eingespritzt wurden 0,010 ml oder 0,020 ml der Proben.

Vorbereitung der Proben:

0,5 ml Allantoisflüssigkeit wurde mit 0,5 ml H₂O dest. im Cup verdünnt, mit 0,05 ml Perchlorsäure (30 %) zum Enteiweißen versetzt und 5 min lang geschüttelt. Anschließend wurde mit ca. 0,04 ml KOH (30 %) neutralisiert, der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Cup umgefüllt. Der Niederschlag wurde in 0,4 ml H₂O dest. resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand mit dem aus der ersten Zentrifugation vereinigt.

Abbildung 1

Chromatogramm der Purinauftrennung mittels HPLC. Die Peaks von Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin und Inosin sind besonders gekennzeichnet.



Die Werte der Harnsäurekonzentration, die über HPLC erhalten wurden, hatten eine große Streuung (Tabelle 3). Deswegen wurden nur die Werte, die nach der enzymatischen Methode ermittelt wurden (vgl. 2.2.6), ausgewertet.

2.2.8. Bestimmung des Volumens der Allantoisflüssigkeit

Die Bestimmung des Volumens der Allantoisflüssigkeit wurde mit Hilfe von Trypanblau durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe einer Trypanblaulösung hergestellt, von der 0,1 ml, in 1,1 ml H_2O gelöst, bei Hg 578 nm eine Extinktion von 0,2 ergaben. Von den aus der Verdünnungsreihe erhaltenen Extinktionswerten wurde eine Eichkurve erstellt.

Für die Bestimmung des Allantoisvolumens wurde in folgender Weise vorgegangen: Die Eischale wurde im Bereich der Allantoisflüssigkeit eröffnet und 0,1 ml der Trypanblauammlösung in die Allantoisflüssigkeit verabreicht; dabei wurde, um eine größere Verletzung der Membran zu vermeiden, Hamiltonspritzen mit sehr dünnen Nadeln eingesetzt. Anschließend wurden die Eier bei 37 - 38 °C geschüttelt (Frequenz: circa 1 - 2 Hertz) um eine homogene Verteilung des Farbstoffs zu erreichen. Nach 30, 45, 60 und 75 min wurden Allantoisproben (0,1 ml) entnommen und die Extinktion im Photometer gemessen. Es zeigte sich, daß sich nach spätestens 45 min ein konstanter Wert einstellt, was als Hinweis für eine homogene Verteilung des Farbstoffs angesehen wurde.

Mit Hilfe der Eichkurve wurde dann das Volumen der Allantoisflüssigkeit ermittelt. Orientierende Versuche ergaben, daß die auf diese Weise ermittelten Werte mit den Volumenenwerten, die durch Absaugen der gesamten Allantoisflüssigkeit erhalten wurden, annähernd identisch waren. Größere Differenzen ergaben sich erst ab dem 13. Tag der Inkubation. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß zu diesem Zeitpunkt sich ein Niederschlag (Harnsäure) in der Allantois-

flüssigkeit bildet, der Trypanblau adsorbiert, und dadurch die Farbkonzentration sich verringert. Die Methode wurde daher nur bis zum 12. Tag eingesetzt.

2.2.9. Kreatininbestimmung

Kreatinin wurde nach der Jaffé-Methode bestimmt. In alkalischer Lösung mit Pikrat bildet Kreatinin einen farbigen Komplex. Die Allantoisflüssigkeit wurde zunächst mit gleicher Menge Trichloressigsäure (1,2 mol/l) gemischt und anschließend der Niederschlag abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit gleicher Menge eines Gemisches aus NaOH (1,6 mol/l) und Pikrinsäure (35 mmol/l) 1 : 1 versetzt und 20 min bei 25 °C geschüttelt. Als Leerwert wurde H₂O dest., anstelle von Allantoisflüssigkeit verwendet. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von Hg 546 nm am Photometer gemessen.

2.2.10. Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode

Die Aktivität der untersuchten Enzyme wurde auf den Proteingehalt der Proben bezogen (Spezifische Aktivität). Die Bestimmung des Proteins erfolgte nach der Biuret-Methode.

Es wurden 0,05 ml einer Probe mit 1 ml Dioxan geschüttelt, um das Fett herauszulösen. Nach dem Zentrifugieren (12.000 U/min) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und der Niederschlag mit Trichloressigsäure (1,2 mol/l) geschüttelt. Nach erneutem Zentrifugieren und Abgießen der Trichloressigsäure wurde 1 ml Biuret-Reagenz zugegeben und geschüttelt, bis der Niederschlag komplett gelöst war. Als Leerwert wurde Biuret-Reagenz verwendet und bei einer Wellenlänge von Hg 546 nm die Extinktion bestimmt.

Im Dottersack wurde auf eine Bestimmung des Proteins verzichtet, und zwar aus folgendem Grunde: Der Dottersack ent-

hielt auch nach mehrmaligem Waschen noch Reste des Dotters, was an der gelben Farbe zu erkennen war. Da in diesen mit Sicherheit Protein des Dotters enthalten ist, gibt eine Protein-Bestimmung unter diesen Umständen nicht ausschließlich das Gewebsprotein wieder, das der spezifischen Aktivität zugrunde liegt.

2.2.11. Statistische Berechnungen

Die Signifikanz wurde mit "Students-T-Test" errechnet. Bei den angegebenen Daten handelt es sich um Mittelwerte ($\bar{x}$), mit den zugehörigen Standardabweichungen ($\pm s$). Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben (n). Die Enzym-Aktivitäten sind in Einheiten wiedergegeben. Eine Einheit (E) ist die Enzymaktivität, die 1 μmol Substrat in 1 min bei 37 °C umsetzt.

3. Ergebnisse

Abbildung 2 zeigt den Verlauf der XDH-Aktivität in der Leber, Niere und Dottersackmembran bezogen auf das homogenisierte Gewebsvolumen (ml), in der prä- und neonatalen Phase. Danach ist die renale XDH-Aktivität pränatal um etwa den Faktor 5 - 6 höher als die entsprechenden Werte in der Leber, während in der neonatalen Phase - bedingt durch den

Abbildung 2

Verlauf der XDH-Aktivität in der Leber, Niere und Dottersackmembran bezogen auf das homogenisierte Gewebsvolumen in der prä- und neonatalen Phase.

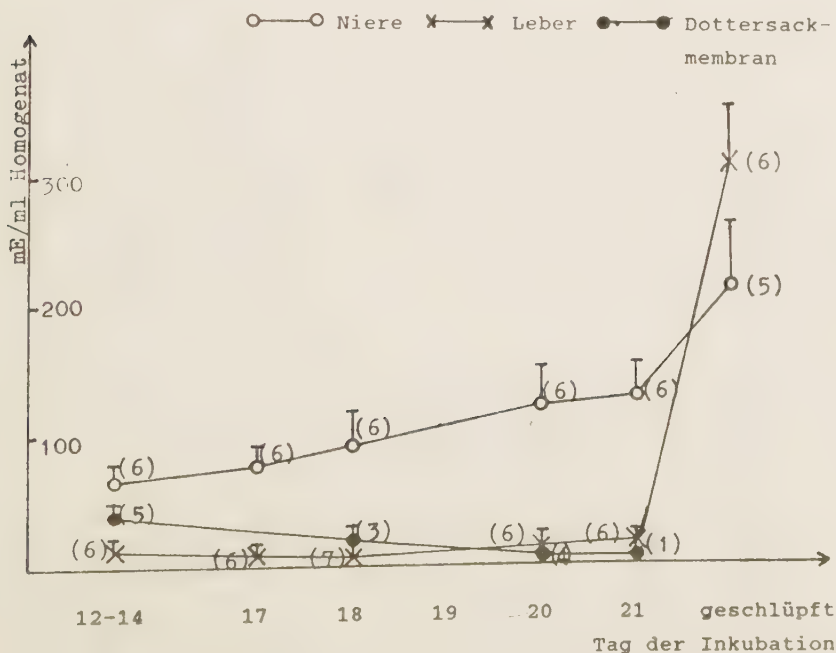


Tabelle 1

Der Einfluß von Allopurinol auf die Harnsäureausscheidung in die Allantoisflüssigkeit. Die Applikation des Allopurinols erfolgte vor dem Bebrüten.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Verabreichte Menge an Allopurinol (mg/Ei)	0,0272	0,136	0,272	0,68	1,36	2,72	6,8	13,6
Harnsäurekonzentration in der Allantoisflüssigkeit (mg/ml)										
7.	0,181 (1)				0,085 (1)					
9.	0,604 ± 0,069 (2)		0,079 (1)		0,197 (1)	0,047 (1)	0,084 (1)			
11.	0,864 ± 0,170 (3)		0,513 (1)		0,337 ± 0,60 (2)	0,023 ± 0,033 (2)	0,028 ± 0,008 (2)	0,063 ± 0,016 (2)	0,037 (1)	0,012 (1)
12.	0,887 ± 0,242 (5)		0,819 ± 0,322 (6)		0,580 ± 0,046 (2)	0,422 (1)				

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Tag der Inkubation	Kontrolle	Verabreichte Menge an Allopurinol (mg/Ei)				
		0,0272	0,136	0,272	0,68	1,36
				2,72	6,8	13,6
		Harnsäurekonzentration in der Allantoisflüssigkeit (mg/ml)				
13.	1,088		0,487	0,324	0,037	0,025
	$\pm 0,406$		(1)	(1)	$\pm 0,018$	(1)
	(4)				(2)	(3)
14.	1,650	1,168	1,634	0,855	1,444	0,079
	$\pm 0,105$	(1)	(1)	$\pm 0,276$	(1)	$\pm 0,048$
	(2)			(2)		(2)
15.	1,958					0,055
	$\pm 0,770$					$\pm 0,014$
	(5)					(3)
17.	2,513					0,137
	$\pm 0,583$					$\pm 0,058$
	(4)					(4)

größeren Aktivitätsanstieg in der Leber - dieses Organ die höheren Werte erreicht. Im Gegensatz zur Leber und Niere verringert sich die XDH-Aktivität in der Dottersackmembran gegen den Schlupf zu.

Eingriffe in den Purinstoffwechsel wurden zunächst mit Hilfe von Allopurinol durchgeführt. Wie Tabelle 1 zeigt, verringert sich unter dem Einfluß von Allopurinol die ausgeschiedene Harnsäuremenge deutlich. Auch ist aus den in Tabelle 1 aufgeführten Werten eine deutliche Abhängigkeit von der verabreichten Allopurinolmenge zu ersehen: Je größer die applizierte Menge war, um so geringer fiel die in der Allantoisflüssigkeit gefundene Harnsäurekonzentration aus. Schließlich bestätigt Tabelle 2 die zu erwartende Inaktivierung der XDH in Leber und Niere.

Tabelle 2

Hemmung der XDH-Aktivität durch Allopurinol

Die Aktivität der Kontrollen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Werte in der Tabelle geben den prozentualen Rest der XDH-Aktivität nach Allopurinolbehandlung (13,6 mg pro Ei) gegenüber den Kontrollen an. Die Applikation des Allopurinols erfolgte vor Beginn der Bebrütung.

Tag der Inkubation	<u>Leber</u>	<u>Niere</u>
	% Aktivität	
14./15.	47 (1)	24 ± 26 (3)
17./18.	31 ± 25 (2)	27 ± 7 (2)
20./21.	53 ± 20 (4)	36 ± 10 (4)

Die Hemmung der XDH-Aktivität durch Allopurinol spiegelt sich auch in der Ausscheidung anderer Purinkörper wider: Die Konzentration von Inosin, Hypoxanthin und Xanthin, die in der Reaktionsfolge der Harnsäurebildung vor der XDH liegen, war unter dem Einfluß von Allopurinol deutlich erhöht (Tabelle 3). Diese Umstellung in der Purinausscheidung vollzog sich ohne deutliche Veränderung des Allantoisvolumens. Auch auf die Kreatininausscheidung hatte Allopurinol keinen Einfluß (Tabelle 3).

Wurde anstelle von Allopurinol Cyclophosphamid eingesetzt, so wurde schon bei einer Dosis von 0,01 mg Cyclophosphamid die Embryogenese nicht eingeleitet bzw. die Embryonen starben innerhalb einer Woche ab. Im folgenden wurde daher Cyclophosphamid zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich am 6., 8. und 10. Tag appliziert und die Embryonen jeweils 2 Tage später untersucht. Ein signifikanter Effekt auf die Harnsäureausscheidung stellte sich ein, wenn die Embryonen am 6. Tag der Inkubation behandelt wurden. Dies führte zu einem deutlichen Anstieg der ausgeschiedenen Harnsäurekonzentration am 8. Tag. Nach Applikation am 8. und 10. Tag waren die Auswirkungen auf die Harnsäureausscheidung an den darauffolgenden Tagen nicht mehr so deutlich (Abbildung 3).

Ähnlich wie die Harnsäurekonzentration erhöhte sich auch die Konzentration von Xanthin und Hypoxanthin bis zum 8. Tag der Bebrütung signifikant. Im Falle von Inosin wurde zwar am 8. Tag im Vergleich zu unbehandelten Embryonen ebenfalls eine erhöhte Konzentration registriert, der Unterschied ließ sich aber statistisch nicht sichern. In den darauffolgenden Tagen war - mit Ausnahme von Xanthin (12. Tag) - kein deutlicher Effekt auf die ausgeschiedenen Purinmetaboliten mehr festzustellen (Abbildung 4, 5 und 6).

Wurde anstelle von Cyclophosphamid 6-MMPR appliziert, so war die Konzentration der Purinmetaboliten in der Allantoisflüssigkeit am 8. Tag deutlich geringer als bei den

Tabelle 3

Einfluß von Allopurinol auf die Purinausscheidung in die Allantoisflüssigkeit. Es wurden 13,6 mg Allopurinol pro Ei vor Beginn der Bebrütung appliziert. Die Untersuchungen wurden am 12. Tag der Bebrütung durchgeführt.

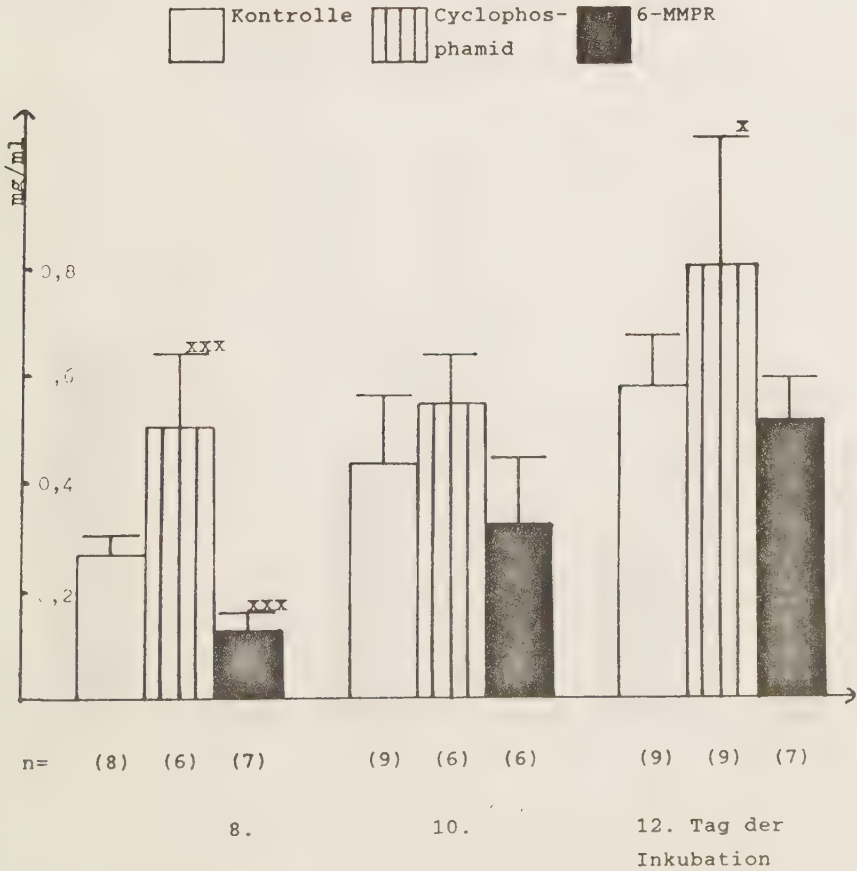
	Kontrolle	Allopurinol	Einheit
Harnsäure (enzymatisch)	0,607 ± 0,082 (7)	0,020 ± 0,004 xxx (12)	mg/ml
Harnsäure (HPLC)	0,983 ± 0,404 (7)	0,027 ± 0,011 xxx (11)	mg/ml
Hypoxanthin	3,60 ± 0,70 (7)	99,23 ± 64,52 xx (11)	µg/ml
Xanthin	3,93 ± 0,86 (7)	62,76 ± 22,14 xxx (11)	µg/ml
Inosin	7,55 ± 2,65 (7)	98,43 ± 32,39 xxx (11)	µg/ml
Volumen der Allantois- flüssigkeit	7,08 ± 1,44 (7)	6,58 ± 1,62 (11)	ml
Kreatinin	9,1 ± 1,8 (7)	11,7 ± 2,8 (12)	µg/ml

xx : p < 0,01

xxx : p < 0,001

Abbildung 3

Der Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR auf die Harnsäurekonzentration in der Allantoisflüssigkeit.

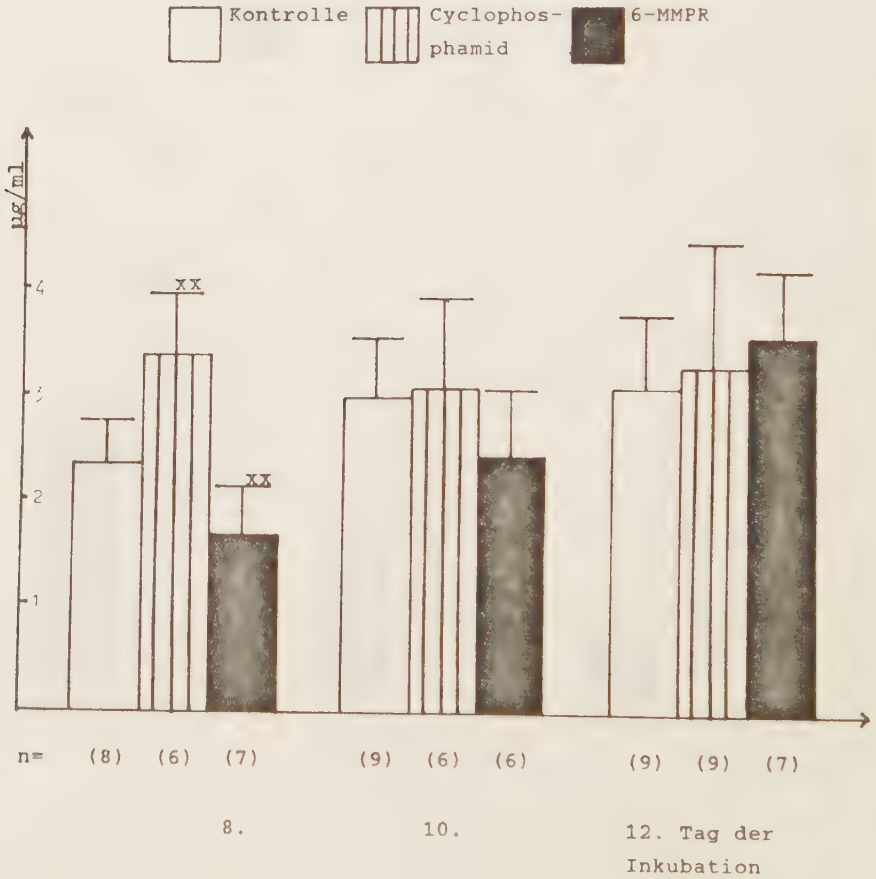


x : $p < 0,05$

xxx : $p < 0,001$

Abbildung 4

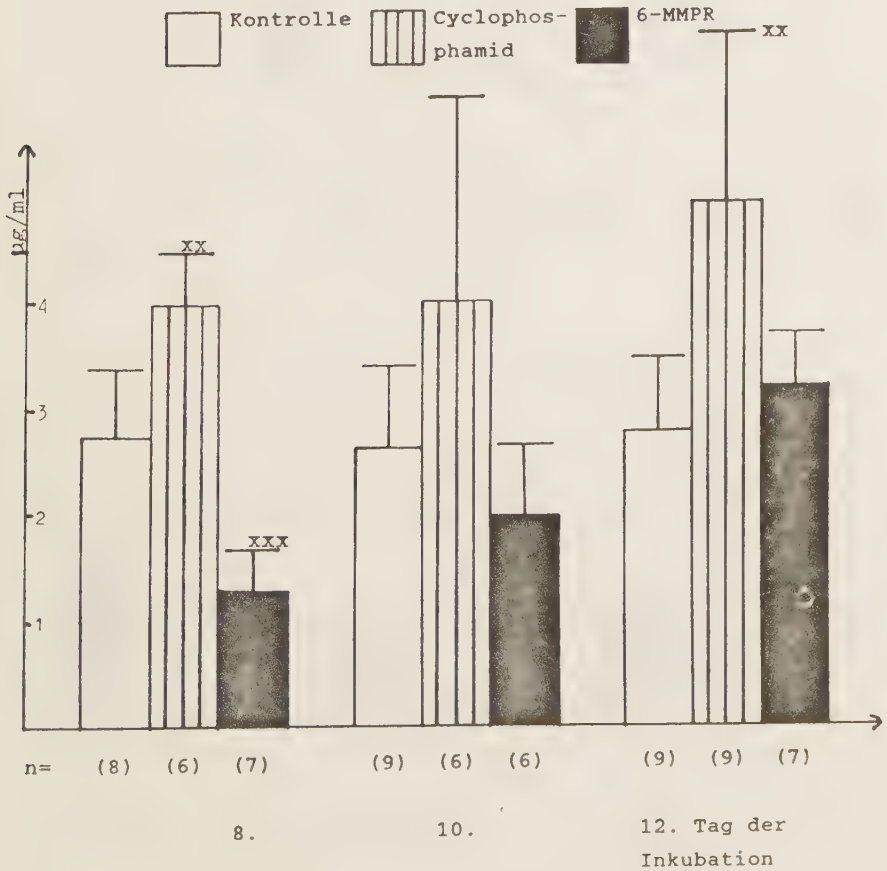
Der Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR auf die Hypoxanthinkonzentration in der Allantoisflüssigkeit.



XX : $p < 0,01$

Abbildung 5

Der Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR auf die Xanthinkonzentration in der Allantoisflüssigkeit.

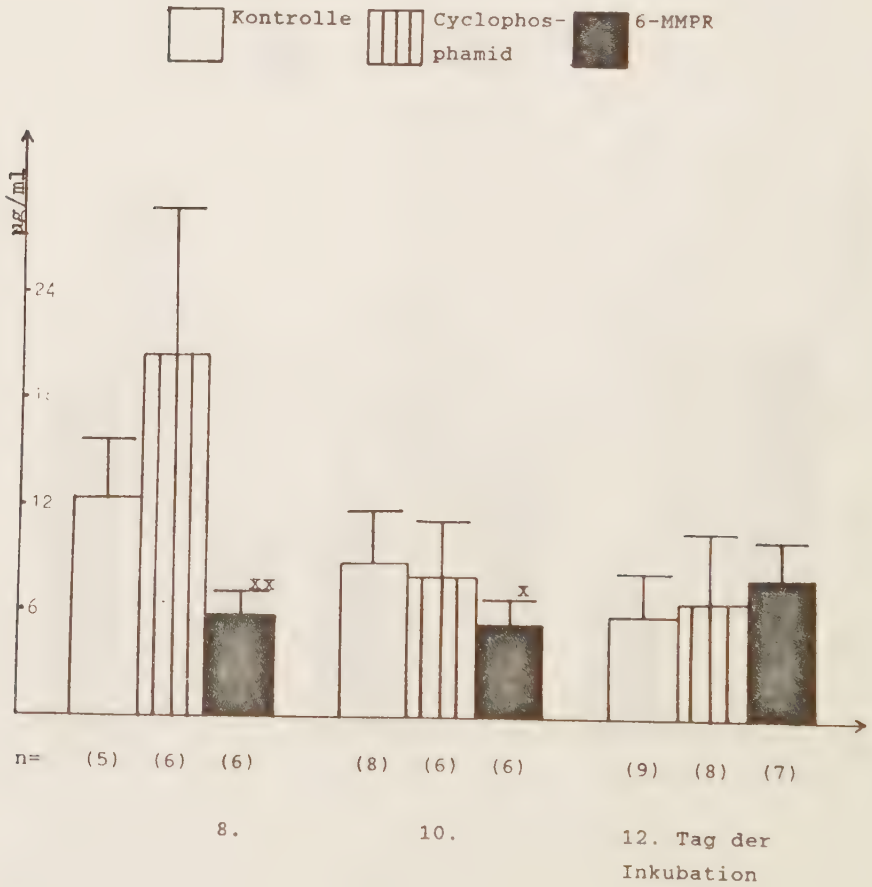


xx : $p < 0,01$

xxx : $p < 0,001$

Abbildung 6

Der Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR auf die Inosinkonzentration in der Allantoisflüssigkeit.



x : $p < 0,05$

xx : $p < 0,01$

Kontrollen. Ein derartiger Unterschied war auch am 10. Tag noch angedeutet, während am 12. Tag sich kein Unterschied zur Kontrolle mehr abzeichnete (Abbildung 3, 4, 5 und 6).

Nachdem eine Konzentrationsveränderung der in die Allantoisflüssigkeit ausgeschiedenen Purine aufgezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob diese in erster Linie durch eine mengenmäßige Veränderung der Purine selbst oder durch eine Veränderung des ausgeschiedenen Flüssigkeitsvolumen zustande kommt. Zu diesem Zwecke wurde ergänzend das Flüssigkeitsvolumen der Allantois und außerdem die ausgeschiedene Kreatininmenge bestimmt, die vielfach als Bezugsgröße für harnpflichtige Stoffe eingesetzt wird. Wie Tabelle 4 und 5 zeigen, hatten die verabreichten Substanzen weder auf das Volumen der Allantoisflüssigkeit noch auf deren Kreatininhalt meßbare Auswirkungen.

Im folgenden interessierte, inwieweit bei den Eingriffen auch die XDH-Aktivität betroffen ist. Am einfachsten gestalteten sich die Untersuchungen am Dottersack, da hierfür entsprechend große Gewebsmengen vorlagen. Im Falle der Leber war erst ab dem 12. Tage eine ausreichende Organgröße erreicht. Da zu diesem Zeitpunkt nur Cyclophosphamid deutliche Veränderungen in der Purinausscheidung hervorrief, beschränkten sich die Analysen in der Leber auf Cyclophosphamid-behandelte Embryonen. Auf Untersuchungen in der Niere mußte wegen der geringen Gewebeproben verzichtet werden. Die Applikation von Cyclophosphamid und 6-MMPR hatte keine deutlichen Auswirkungen auf die XDH-Aktivität der Dottersackmembran (Abbildung 7). Hingegen führte die Verabreichung von Cyclophosphamid zu einer deutlichen Steigerung der XDH-Aktivität in der Leber (Abbildung 8).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde nun der Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR auf den Purinstoffwechsel in der Endphase der Inkubation untersucht. Dabei wurden die Substanzen am 17. Tag appliziert und die Analysen in den darauffolgenden Tagen durchgeführt. Die größeren Organproben

Tabelle 4

Das Volumen der Allantoisflüssigkeit unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR	
		ml	
8.	$2,40 \pm 0,58$ (8)	$1,91 \pm 0,29$ (6)	$1,90 \pm 0,29$ (7)
10.	$5,36 \pm 1,65$ (9)	$5,13 \pm 0,93$ (6)	$4,96 \pm 1,26$ (6)
12.	$10,02 \pm 2,58$ (9)	$8,26 \pm 2,09$ (9)	$7,41 \pm 3,08$ (7)

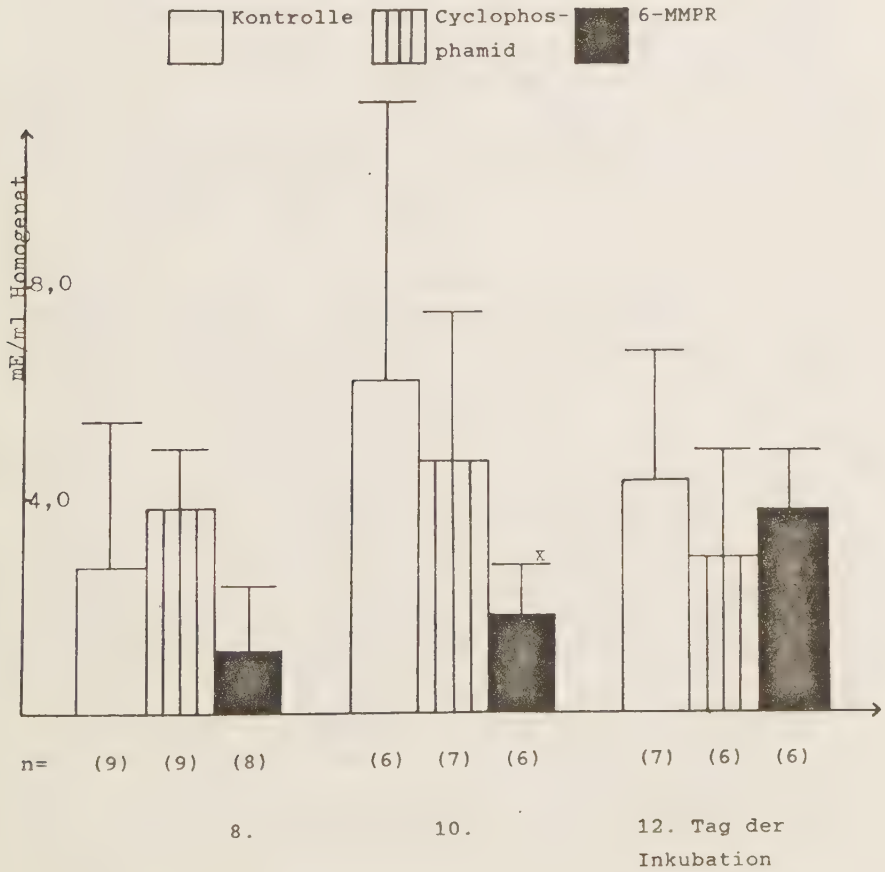
Tabelle 5

Kreatininkonzentration in der Allantoisflüssigkeit unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR	
		$\mu\text{g/ml}$	
8.	$5,5 \pm 1,0$ (8)	$7,1 \pm 1,6$ (6)	$6,0 \pm 0,9$ (7)
10.	$9,3 \pm 1,5$ (9)	$8,8 \pm 1,0$ (6)	$9,8 \pm 1,5$ (6)
12.	$11,5 \pm 2,5$ (9)	$12,2 \pm 4,9$ (9)	$15,6 \pm 4,7$ (7)

Abbildung 7

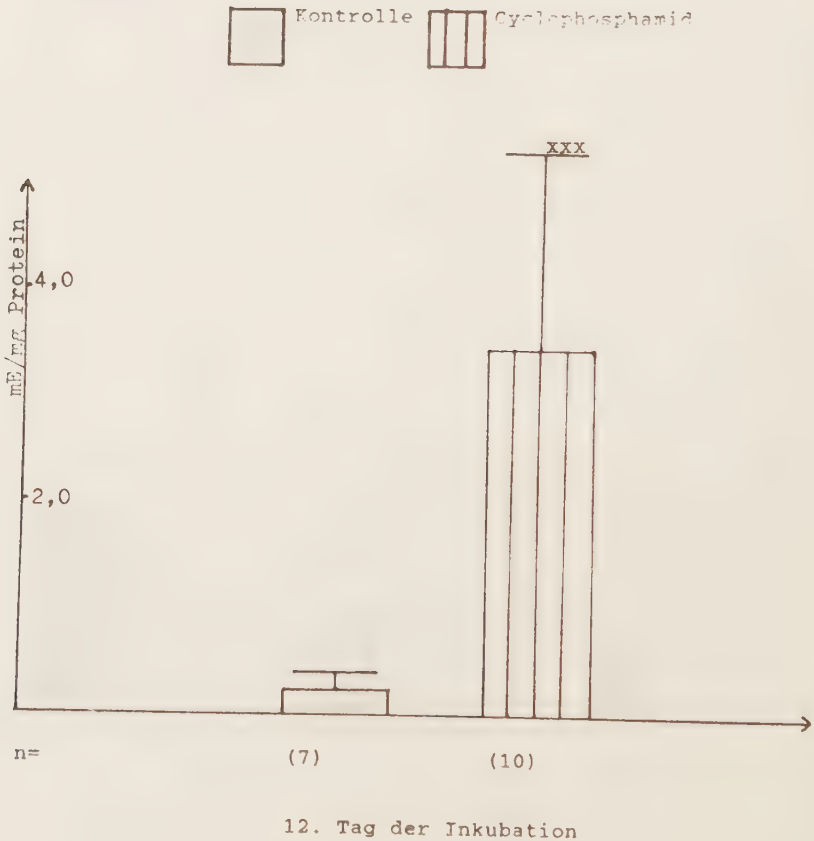
Die Aktivität der XDH in der Dottersackmembran unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.



x : $p < 0,05$

Abbildung 8

Die Aktivität der XDH in der Leber am 12. Tag der Inkubation unter dem Einfluß von Cyclophosphamid.



xxx : $p < 0,001$

in dieser Entwicklungsphase erlaubten umfassendere enzymatische Analysen. Hingegen war eine Analysierung der Ausscheidungsprodukte nicht mehr möglich, da die Allantoisflüssigkeit zu diesem Zeitpunkt vom Embryo bereits resorbiert ist.

Wie Abbildung 9 zeigt, erhöhte sich nach 2- und 3-tägiger Einwirkungsdauer von 6-MMPR die XDH-Aktivität in der Leber signifikant. Im Falle von Cyclophosphamid war lediglich am 19. Tag ein deutlicher Anstieg der XDH zu beobachten. In der Niere und der Dottersackmembran schließlich lösten diese Substanzen keine Veränderung der XDH-Aktivität aus (Tabelle 6 und 7), wobei die Werte in der Dottersackmembran zum Teil unter der Nachweisgrenze lagen.

Ergänzend zu diesen Befunden wurde untersucht, inwieweit bei den Eingriffen mit Cyclophosphamid und 6-MMPR neben dem Abbau der Purine, der durch die XDH charakterisiert wird, auch die Synthese der Purine betroffen ist. Zu diesem Zwecke wurde die GS und PRPP-TA bestimmt.

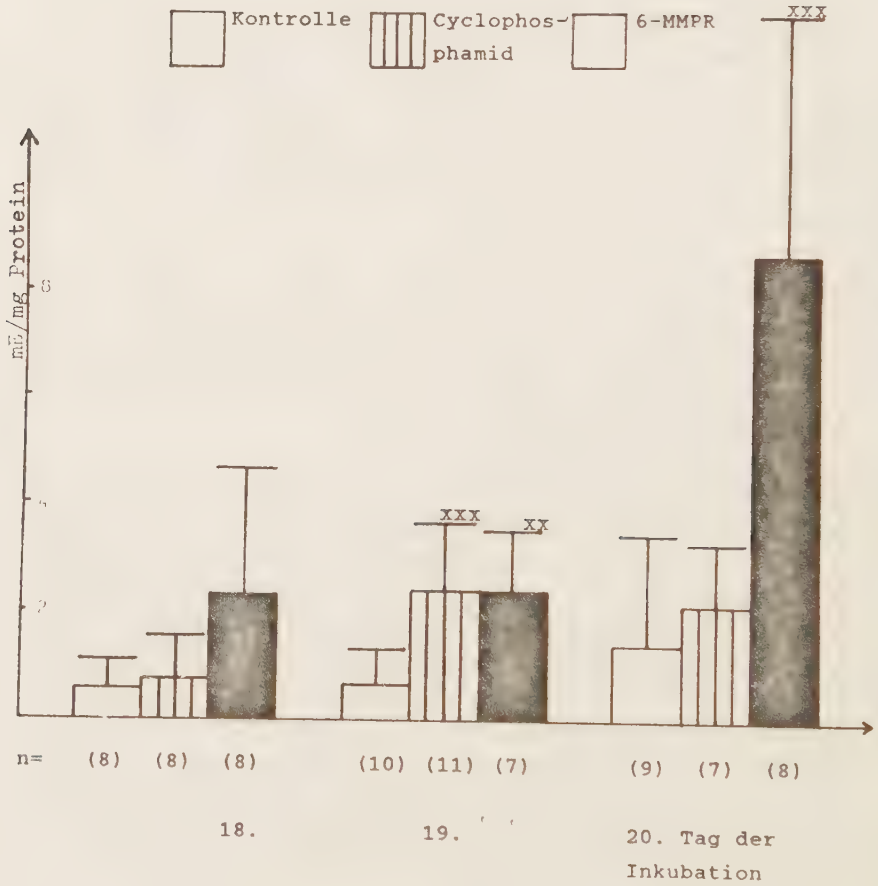
Diese Untersuchungen ergaben, daß 6-MMPR spätestens 2 Tage nach Applikation die GS im Niederschlag der Leber stimuliert (Abbildung 10). Cyclophosphamid hingegen führte ähnlich wie bei der XDH nur am 19. Tag zu einer Aktivierung der GS (Abbildung 10). Im Überstand waren die Unterschiede bei beiden Substanzen nicht deutlich ausgeprägt (Abbildung 11).

In der Dottersackmembran hatten die Substanzen keine Auswirkungen auf die GS (Tabelle 8), und in der Niere schließlich konnte keine GS-Aktivität nachgewiesen werden. Auch auf die PRPP-TA hatte die Applikation von Cyclophosphamid bzw. 6-MMPR keine deutlichen Auswirkungen (Abbildung 12).

Da andererseits bekannt ist, daß 6-MMPR hemmend auf dieses Enzym einwirkt, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob sich das Enzym unter "in vitro" Bedingungen inaktivieren läßt. Zu diesem Zweck wurde der Überstand aus dem Leberhomo-

Abbildung 9

Die Aktivität der XDH in der Leber unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.



xx : $p < 0,01$

xxx : $p < 0,001$

Tabelle 6

Die Aktivität der XDH in der Niere unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR	
		mE/mg Protein	
18.	$6,03 \pm 0,81$ (5)	$5,92 \pm 2,34$ (6)	$8,01 \pm 2,88$ (6)
19.	$7,32 \pm 2,28$ (9)	$8,25 \pm 3,47$ (9)	$8,43 \pm 2,33$ (12)
20.	$6,21 \pm 2,81$ (7)	$8,35 \pm 3,23$ (8)	$9,36 \pm 4,31$ (6)

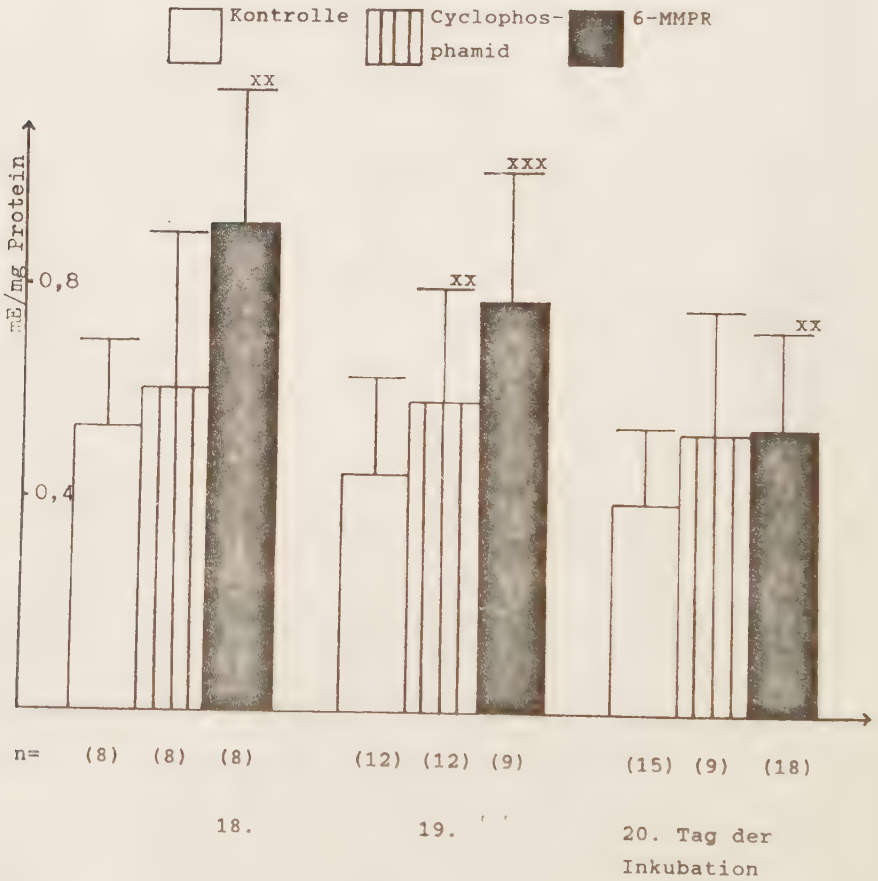
Tabelle 7

Die Aktivität der XDH in der Dottersackmembran unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR	
		mE/mg Protein	
18.	$0,97 \pm 0,32$ (6)	$0,82 \pm 0,34$ (6)	$0,77 \pm 0,31$ (6)
19.	$0,55 \pm 0,27$ (6)	$0,42 \pm 0,21$ (6)	$0,39 \pm 0,21$ (6)
20.	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Abbildung 10

Die Aktivität der GS im Niederschlag der homogenisierten Leber unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

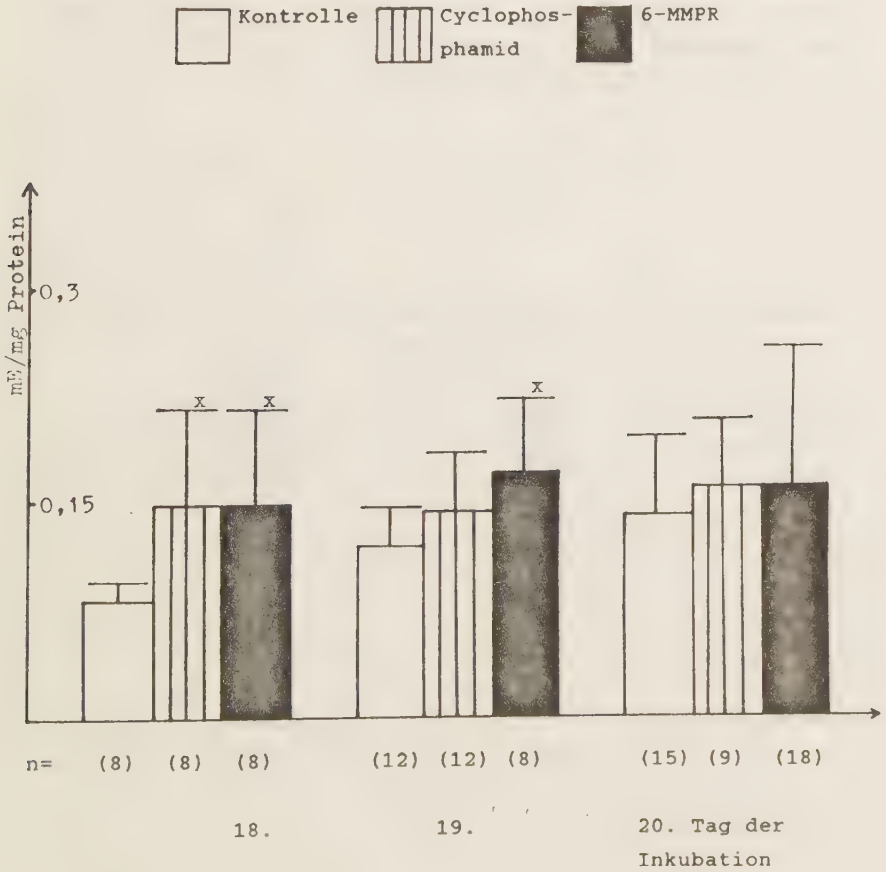


xx : $p < 0,01$

xxx : $p < 0,001$

Abbildung 11

Die Aktivität der GS im Überstand der homogenisierten Leber unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.



x : p < 0,05

genat mit unterschiedlichen 6-MMPR-Konzentrationen versetzt und anschließend die PRPP-TA im Überstand bestimmt. Dabei zeigte sich keine Abnahme der Aktivität im Vergleich zum Überstand, der ohne 6-MMPR inkubiert wurde (Tabelle 9).

In Tabelle 10 - 12 sind die Proteinwerte wiedergegeben, die der Berechnung der spezifischen Aktivität der entsprechenden Enzyme zugrunde liegen. Danach hatte die Applikation der oben genannten Substanzen keinen Einfluß auf den zellulären Proteingehalt der Leber und Niere.

Tabelle 8

Die Aktivität der GS in der Dottersackmembran unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Cyclophosphamid 6-MMPR		
	Kontrolle	mE/mg Protein	
18.	$0,011 \pm 0,008$ (6)	$0,013 \pm 0,006$ (6)	$0,012 \pm 0,006$ (6)
19.	$0,015 \pm 0,007$ (8)	$0,014 \pm 0,008$ (7)	$0,008 \pm 0,007$ (6)
20.	$0,015 \pm 0,005$ (6)	$0,018 \pm 0,009$ (6)	$0,016 \pm 0,008$ (6)

Abbildung 12

Die Aktivität der PRPP-TA in der Leber unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

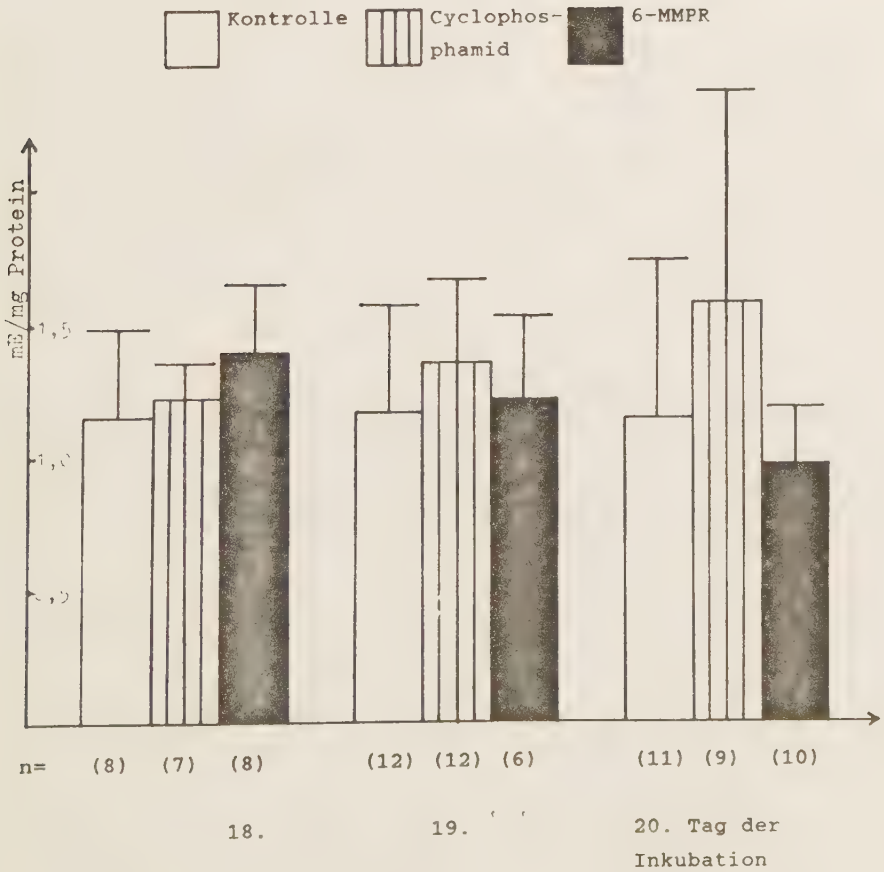


Tabelle 9

Die Spez. Aktivität der PRPP-TA nach Inkubation mit 6-MMPR "in vitro".

Versuch	Überstand ohne 6-MMPR	Überstand mit 6-MMPR mE/mg Protein
1	1,14	0,98
2	0,79	0,79
3	2,66	3,22
4	2,57	2,85

Tabelle 10

Die Proteinkonzentration im Überstand der homogenisierten Leber unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR mg/ml	
18.	10,7 $\pm$ 1,07 (8)	10,9 $\pm$ 1,21 (8)	10,9 $\pm$ 0,93 (8)
19.	11,2 $\pm$ 1,14 (12)	11,2 $\pm$ 0,86 (12)	11,9 $\pm$ 1,29 (8)
20.	10,0 $\pm$ 0,86 (15)	11,4 $\pm$ 0,55 (9)	10,4 $\pm$ 2,00 (18)

Tabelle 11

Die Proteinkonzentration im Niederschlag der homogenisierten Leber unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR	
		mg/ml	
18.	$6,2 \pm 1,00$ (8)	$5,1 \pm 0,79$ (8)	$5,9 \pm 0,93$ (8)
19.	$8,9 \pm 2,43$ (12)	$8,8 \pm 1,21$ (12)	$10,2 \pm 2,00$ (9)
20.	$6,8 \pm 1,71$ (15)	$6,3 \pm 1,07$ (9)	$7,1 \pm 2,14$ (18)

Tabelle 12

Die Proteinkonzentration im Überstand der homogenisierten Niere unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR.

Tag der Inkubation	Kontrolle	Cyclophosphamid 6-MMPR	
		mg/ml	
18.	$11,98 \pm 1,39$ (6)	$10,91 \pm 1,99$ (6)	$11,26 \pm 1,64$ (7)
19.	$11,11 \pm 2,02$ (9)	$12,51 \pm 0,92$ (7)	$12,23 \pm 1,54$ (12)
20.	$11,81 \pm 1,57$ (10)	$12,22 \pm 0,97$ (10)	$12,95 \pm 1,27$ (6)

4. Diskussion

Die Harnsäurebildung erfährt im Verlauf der embryonalen Entwicklung des Kükens eine vielschichtige Umstellung. Wie aus Abbildung 2 zu ersehen ist, weisen Niere und Dottersackmembran etwa um die Mitte der embryonalen Phase schon eine nennenswerte XDH-Aktivität auf. Im Vergleich zur Niere ist die Aktivität der Dottersackmembran zwar deutlich geringer, bedenkt man aber, daß das Gewicht der Dottersackmembran das der Niere um ein Vielfaches übersteigt, so muß der Dottersackmembran bei der Harnsäurebildung eine wesentliche, vielleicht sogar die entscheidende Rolle zugebilligt werden. Diese Funktion verringert sich gegen Ende der Inkubation zu sehends, während die Leber offensichtlich an Bedeutung gewinnt, insbesondere mit dem signifikanten Anstieg in der neonatalen Phase.

Diese Umstellung legt die Vermutung nahe, daß die Funktion der Dottersackmembran neonatal von der Leber übernommen wird. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß bereits im vorigen Jahrhundert die Dottersackmembran hinsichtlich des Glukosestoffwechsels als pränatale Leber betrachtet wurde (BERNARD, 1872).

Trotz des späten Einsetzens der intensiven Harnsäurebildung in der Leber ist die Anlage hierzu schon sehr früh ausgebildet: Nach Applikation von Cyclophosphamid konnte bereits am 12. Tag eine signifikante Steigerung der XDH-Aktivität beobachtet werden.

Eine Aktivierung der XDH in der Dottersackmembran war unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten. Offensichtlich ist die Dottersackmembran nicht in der Lage, bei erhöhtem Anfall von Purinmetaboliten deren Eliminierung auf dem Wege einer erhöhten Harnsäurebildung einzuleiten.

Dies gilt allem Anschein nach auch für die Niere. In der Ar-

beit wurde zwar das Verhalten der renalen XDH in diesem frühen Stadium der Entwicklung nicht untersucht, die Befunde gegen Ende der Inkubation zeigen aber deutlich, daß eine Stimulierung der renalen XDH auch im fast ausgereiften Embryonalstadium nicht eintritt. Dies steht im Einklang mit früheren Befunden. Cycloheximid und Thioharnstoff erhöhten am Ende der pränatalen Phase die XDH-Aktivität der Leber, jedoch nicht der Niere, und im Falle von Dexamethason stand einer Aktivierung des Enzyms in der Leber sogar eine Inaktivierung in der Niere gegenüber (PRUY, 1982; WITTMANN and PRUY, 1983; WITTMANN et al., 1986).

Dieses Verhalten ist insofern überraschend, als die XDH-Aktivität auch in der Niere beim Übergang von der prä- in die neonatale Phase ansteigt. Außerdem zeigen Befunde, daß zwischen renaler und hepatischer XDH weder immunochemische noch elektrophoretische noch kinetische Unterschiede bestehen. Allem Anschein nach handelt es sich in beiden Organen um ein und dasselbe Enzym (CROISILLE, 1963; CURTIS, 1968).

Damit stellt sich die Frage, welche Stimulatoren der Zunahme der XDH-Aktivität zugrunde liegen. Nach den Befunden von Murison (1969) basiert die perinatal einsetzende Aktivitätszunahme einmal auf einer gesteigerten Zunahme der Enzymsynthese und zum anderen auf eine Reduzierung des Enzymabbaus. Es bleibt zu klären, ob dieser Mechanismus auch für die in dieser Arbeit beobachtete Aktivierung zutrifft.

In diesem Zusammenhang sei vermerkt, daß, wie oben bereits ausgeführt wurde, eine pränatale Aktivierung der XDH auch nach Behandlung mit Cycloheximid, einer Substanz, die eine Hemmung der Proteinsynthese bewirkt, bzw. mit Thioharnstoff, einer Substanz, die hemmend in die Entwicklung eingreift, zu beobachten ist (PRUY, 1982; WITTMANN and PRUY, 1983). Es ist zu vermuten, daß mit den genannten Substanzen in den Nucleinsäuren- und Proteinstoffwechsel eingegriffen wird und als Folge davon dann stickstoffhaltige Produkte anfallen, die in Form von Harnsäure letztlich ausgeschieden werden.

Demnach könnte eine pränatale Zunahme der katalytischen Kapazität der XDH durch eine Substrataktivierung zustande kommen. Daß Purinmetaboliten, wie z. B. Inosin und Adenin, die XDH aktivieren, kann als gesichert angesehen werden (DELLA CORTE and STIRPE, 1966; VINCENT et al., 1984).

Ein derartiger Mechanismus ist auch bei der Aktivitätszunahme, die unter dem Einfluß von Cyclophosphamid und 6-MMPR beobachtet wurde, nicht auszuschließen. Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, greift 6-MMPR direkt und Cyclophosphamid über den Nucleinsäurenstoffwechsel in den Purinstoffwechsel ein. Wegen der engen Verknüpfung zwischen Purin- und Proteinstoffwechsel sind auch Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel zu erwarten. In beiden Fällen muß daher mit einer Zunahme von Aminoprodukten gerechnet werden, die über die Harnsäure wieder ausgeschieden werden müssen.

In Einklang damit steht der Befund, daß nach Gaben von Cyclophosphamid am 6. Tag eine deutlich erhöhte Harnsäuremenge am 8. Tag in der Allantoisflüssigkeit gefunden wurde. Die dabei gleichzeitig registrierte Steigerung der Purine wie Xanthin, Hypoxanthin und Inosin, die im Stoffwechselweg vor der XDH stehen, sprechen ebenfalls für eine vermehrte Purinkörperbildung unter dem Einfluß von Cyclophosphamid.

Überraschenderweise konzentrieren sich diese Effekte von Cyclophosphamid und 6-MMPR im wesentlichen auf den 8. Tag der Inkubation. Möglicherweise wären für die folgenden Tage höhere Dosen erforderlich gewesen, um ausgeprägte Auswirkungen in der Purinausscheidung auszulösen. Bei diesen höheren Dosierungen starben die Embryonen jedoch ab. Geht man vom oben aufgezeigten Mechanismus aus, so überrascht, daß 6-MMPR die Ausscheidung der Purinkörper in die Allantoisflüssigkeit verringerte, obgleich es in der späten Embryonalphase, ähnlich wie bei Cyclophosphamid, eine Zunahme der XDH-Aktivität auslöste.

Es ist jedoch zu bedenken, daß der Eingriff in den Protein-

und Purinstoffwechsel bei Cyclophosphamid und 6-MMPR in unterschiedlicher Weise zustande kommt. Dies könnte auch die Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Harnsäureausscheidung darstellen. Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, greift 6-MMPR auf der Stufe der PRPP-TA in die Synthese des Purinringes ein und verhindert außerdem die Bildung von AMP und GMP aus IMP. Eine Hemmung der Purinsynthese als Ursache der verringerten Harnsäureausscheidung würde zwar eine befriedigende Erklärung für die verringerte Harnsäurebildung darstellen, sie erscheint aber nicht sehr wahrscheinlich, da die Arbeit keinen Hinweis enthält, daß 6-MMPR unter den angewandten Bedingungen diesen Schritt der Purinsynthese tatsächlich hemmt (Abbildung 12, Tabelle 9). Dieser Befund ist allerdings nicht überraschend, da bereits bekannt ist, daß 6-MMPR die PRPP-TA auch in der Taubenleber nicht hemmt (WYNGAARDEN and HOLMES, 1977).

Damit bleibt nur noch der 2. Angriffspunkt, nämlich die Hemmung der AMP- und GMP-Bildung aus IMP. Man kann davon ausgehen, daß in dieser Situation die Zelle die Bildung von AMP und GMP über den Salvage Pathway intensiviert. Als Folge davon ist mit einer verstärkten Reaktivierung von Purinkörpern, wie Adenin, Guanin, Adenosin und Guanosin zu rechnen, die dadurch dem Abbau zur Harnsäure entzogen werden. Dies sollte letztlich zu einer Beeinträchtigung der Harnsäurebildung führen. Die in Abbildung 3 - 6 aufgezeigte Abnahme der Purinmetabolite in der Allantoisflüssigkeit könnte als Ausdruck für diese Stoffwechselumstellung angesehen werden. Legt man diesen Vorgang für die reduzierte Purinausscheidung nach Behandlung mit 6-MMPR zugrunde, so überrascht, daß unter dem Einfluß von 6-MMPR die XDH-Aktivität sich erhöhte. Die Ursache für das konträre Verhalten - Abfall der ausgeschiedenen Purinkörper, Zunahme der XDH-Aktivität - im Purinstoffwechsel ist nicht bekannt.

Auffallend ist in diesem Zusammenhang aber die enge Korrelation der XDH-Aktivität mit der der Glutamin-Synthetase: Die Aktivitäten beider Enzyme steigen in der Leber perinatal an

und verringern sich in der Dottersackmembran. Bei beiden Enzymen lösten pränatal Cyclophosphamid und 6-MMPR eine Aktivierung aus, und zwar lediglich in der Leber. Schließlich ist auch vom erwachsenen Huhn ein paralleles Verhalten beider Enzyme bekannt. So löste Futterentzug oder proteinreiche Diät eine Aktivierung der GS und der XDH in der Leber aus (STIRPE and DELLA CORTE, 1965; SCHOLZ and FEATHERSTON, 1968; WOODWARD et al., 1975; FISHER et al., 1976).

Auch wenn bisher kein gemeinsames Agens aufgezeigt werden konnte, so machen die Befunde dennoch deutlich, daß die Regulierung der beiden Enzyme in der Leber eng miteinander korreliert ist. In der Niere ist die Situation schon wegen der fehlenden GS-Aktivität anders geartet. Dort lösten Cyclophosphamid und 6-MMPR auch keine Aktivierung der XDH aus.

Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, kommt in der Aktivitätszunahme der GS und XDH in Stoffwechselsituationen, die mit einer Freisetzung von Amino-Gruppen einhergehen, die herausragende Bedeutung des Purinstoffwechselweges für deren Entgiftung und Ausscheidung beim Vogel zum Ausdruck. Der gleichzeitige Anstieg der GS- und XDH-Aktivität nach Behandlung mit 6-MMPR ist, ähnlich wie nach Behandlung mit Cyclophosphamid, als Hinweis eines gestörten Proteinstoffwechsels zu sehen. Wenn es unter diesen Umständen dennoch nicht zur erhöhten Harnsäureausscheidung kommt, so dürfte dies darauf zurückzuführen sein, daß die Zelle gleichzeitig der eigentlichen Noxe des 6-MMPR, nämlich dem Ausfall der AMP- und GMP-Bildung über den Salvage Pathway nach dem oben gezeigten Schema entgegenwirkt. Mit den dargelegten Vorstellungen lassen sich die Befunde in ein befriedigendes Konzept einordnen.

Dies schließt jedoch nicht aus, daß auch noch andere Aspekte dabei eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß bei den Untersuchungen nicht alle an der Harnsäurebildung beteiligten Organe untersucht wurden. Immerhin

aber dürften mit der Niere, der Leber und der Dottersackmembran die bestimmenden Organe analysiert worden sein.

Insgesamt machen die Befunde dieser Arbeit deutlich, daß der heranwachsende Hühnerembryo über vielfältige Möglichkeiten verfügt, Noxen des Purinstoffwechsels entgegenzuwirken:

Eine Hemmung der Harnsäurebildung auf der Stufe der XDH durch Allopurinol beantwortet er mit einer verstärkten Ausscheidung der Purine, die vor der Harnsäurebildung liegen. Eine Hemmung der AMP- und GMP-Bildung löst allem Anschein nach eine verringerte Harnsäureausscheidung als Folge eines gesteigerten Salvage Pathway aus und bei erhöhtem Anfall von Aminogruppen aus dem Purinstoffwechsel wird die Purinsynthese über eine gesteigerte GS-Aktivität intensiviert. Dabei wird offensichtlich mit dem parallel einhergehenden Anstieg der XDH-Aktivität die Möglichkeit einer gesteigerten Harnsäurebildung geschaffen, der allerdings eine limitierte Substratverfügbarkeit entgegenstehen kann.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Allopurinol, Cyclophosphamid und 6-Methylmercaptapurinribosid auf den Purinstoffwechsel von Hühnerembryonen untersucht.

Allopurinol wurde gleich zu Beginn der Inkubation in die Luftkammer appliziert, während Cyclophosphamid und 6-Methylmercaptapurinribosid etwa um die Mitte und gegen Ende der Embryogenese verabreicht wurden.

Es zeigte sich, daß Allopurinol zu einem deutlichen Abfall in der Harnsäure- und zu deutlichem Anstieg der Inosin-, Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung in die Allantois führt.

Eine verminderte Ausscheidung von Purinkörpern in die Allantois wurde nach Behandlung mit 6-Methylmercaptapurinribosid festgestellt. Bei Behandlung mit Cyclophosphamid stieg die Purinkörperausscheidung an.

Sowohl 6-Methylmercaptapurinribosid, als auch Cyclophosphamid führten zu einer Aktivitätssteigerung von Glutaminsynthetase und Xanthindehydrogenase in der Leber, wenn sie am 17. Bebrütungstag ins Ei appliziert wurden. Unter diesen Bedingungen wurde weder eine Wirkung auf die Aktivität der Xanthindehydrogenase in der Niere und Dottersackmembran, noch auf die Aktivität der Glutamin-Synthetase in der Dottersackmembran registriert.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit besitzt der Hühnerembryo vielfältige Möglichkeiten die Ausscheidung der Purinbasen zu steuern.

5. Summary

The influence of allopurinol, cyclophosphamide and 6-methylmercaptapurineriboside on the synthesis and excretion of purines in the chick embryo

In the work presented here the effects of allopurinol, cyclophosphamide and 6-methylmercaptapurineriboside on the purine metabolism of embryonic chicks were investigated.

Allopurinol was administered into the air cell at the very beginning of incubation, whereas cyclophosphamide and 6-methylmercaptapurineriboside were injected at about the middle and towards the end of incubation.

Allopurinol led to a significant decrease in the release of uric acid and an increase of purines like inosine, xanthine and hypoxanthine in the allantoic liquid.

Treatment with 6-methylmercaptapurineriboside was followed by a decreased excretion of purines into the allantoic liquid. The reverse was true when chick embryos were treated with cyclophosphamide.

Both, 6-methylmercaptapurineriboside and cyclophosphamide, injected on day 17 of incubation into the egg led to an activation of glutamine synthetase and xanthine dehydrogenase in liver. No effect was recorded under these conditions with the renal xanthine dehydrogenase activity and the xanthine dehydrogenase and glutamine synthetase activity in the yolk sack.

On the basis of the findings reported in this work, chick embryo has already developed different facilities regulating excretion of purine bases.

6. Literaturverzeichnis

ALLAN, P.W., H.P. SCHNEBLI and L.L. BENNETT, 1966

Conversion of 6-mercaptapurine and 6-mercaptapurine
ribonucleoside to 6-methylmercaptapurine ribonucleotide
in human epidermoid carcinoma no. 2 cells in culture
Biochim. Biophys. Acta 114, 647-650

BAKER, H.T. and L.L. BENNETT Jr., 1964

Inhibition by 6-mercaptapurin ribonucleotide of the
conversion of inosinic acid to adenylic acid in cell-
free systems from mercaptapurine-sensitive and mercap-
to purine-resistant mammalian cells
Biochim. Biophys. Acta 80, 497-499

BAND, P.R., D.S. SILVERBERG and J.F. HENDERSON , 1970

Xanthine nephropathy in a patient with lymphosarcoma
treated with allopurinol
N. Engl. J. Med. 283, 354-357

BARRATT, E., P.J. BUTTERY and BOORMAN, 1974

Urate synthesis in the perfused chick liver
Biochem. J. 144, 189-198

BENNETT, L.L., R.W. BROCKMANN, H.P. SCHNEBLI, S. CHUMLEY,
G.J. DIXON, F.M. SCHABEL, E.A. DULMADGE, H.E. SKIPPER,
J.A. MONTGOMERY and H.J. THOMAS, 1965

Activity and mechanism of action of 6-methylthiopurine
ribonucleoside in cancer cells resistant to 6-mercapto-
purine
Nature 205, 1276-1279

BENNETT, L.L., L. SIMPSON, J. GOLDEN and T.L. BARKER, 1963

The primary site of inhibition by 6-mercaptapurine on
the purine biosynthetic pathway in some tumors in vivo
Cancer Res. 23, 1574-1580

- BERGMEYER, H.U., E. BERNT, F. SCHMIDT und H. STARK, 1970
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim, pp. 1659-1663
- BERNARD, C., 1872
Glycogenese animale
C. r. hebd. Leanc. Acad. Sci., Paris 75, 55-60
- BIEN, E.J., T.F. YÜ, J.D. BENEDICT, A.B. GUTMAN and
D. STETTEN, 1953
The relation of dietary nitrogen consumption to the
rate of uric acid synthesis in normal and gouty man
J. Clin. Invest. 32, 778-780
- BLOOMFIELD, R.A., A.A. LETTER and R.P. WILSON, 1969
The effect of glycine on ammonia intoxication and uric
acid biosynthesis in the avian species
Arch. Biochem. Biophys. 129, 196-201
- BOTZENHARDT, U. and E.-M. LEMMEL, 1976
Comparison of the immunosuppressive efficacy of
6-mercaptopurine, azathioprine, cyclophosphamide and
036.5122 (asta) on the primary and secondary immune
response of mice to sheep erythrocytes
Agents and Actions 6, (Birkhäuser Verlag Basel) 596-601
- BOWERING J., D.H. CALLOWAY, S.MORGEN and W.A. KAUFMANN, 1969
Dietary protein level and uric acid metabolism in
normal man
J. Nutr. 100, 249-261
- BUTROS, J. and U. KHALIDI, 1966
Xanthine dehydrogenase activity during chick
development
Acta Embryol. Morphol. Exptl. 9, 164-168

BURCHENAL, J.H., R.R. ELLISON and M.L. MURPHY, 1954

Clinical studies on 6-mercaptopurine

Ann. N.Y. Acad. Sci. 60, 359-368

CAMPBELL, J.A. and J.E. VORHABEN, 1976

Avian mitochondrial glutamine metabolism

J. Biol. Chem. 251, 781-786

CASKEY, C.T., D.M. ASHTON and J.B. WYNGAARDEN, 1964

The enzymology of feedback inhibition of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by purine ribonucleotides

J. Biol. Chem. 239, 2570-2579

CHAUBE, S., 1962

Hypoxanthine dehydrogenase in the developing chick embryonic kidney

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 340-342

CROISILLE, Y., 1963

Developmental, kinetic and immunological studies of enzymes

Carnegie Inst. Washington, Yearbook 62, 428-437

CROISILLE, Y., 1965

Hypoxanthine-deshydrogenase dans les organes du poulet adulte et embryonnaire.

in: Protides of biological fluids,

H. Peters (ed.), 12, 199-202

CURTIS, I.L., 1968

Thesis, Florida State University

DELLA CORTE, E. and F. STIRPE, 1966

Regulation of xanthine dehydrogenase in chick liver. Further experimentation on the effects of inosine, actinomycin D and other factors

Biochem. J. 94, 309-313

DELLA CORTE, E. and F. STIRPE, 1967

Regulation of xanthine dehydrogenase in chick liver.
Further experimentation on the effects of inosine,
actinomycin D and other factors.

Biochem. J. 102, 520-524

DELLA CORTE, E. and F. STIRPE, 1968

Regulation of xanthine oxidase in rat liver: modifications of the enzyme activity of rat liver supernatant on storage at -20°C

Biochem. J. 108, 349-351

DELLA CORTE, E. and F. STIRPE, 1970

The regulation of xanthine oxidase

Biochem. J. 117, 97-100

DELLA CORTE, E. and F. STIRPE, 1972

The regulation of rat liver xanthine oxidase

Biochem. J. 126, 739-745

DE RENZO, E.C., 1956

Chemistry and biochemistry of xanthine oxidase

Adv. Enzymol. 17, 293-328

DEUEL, T.F., M. LOWIE and A. LERNER, 1978

Glutamine synthetase from rat liver. Purification, properties and preparation of specific antisera

J. Biol. Chem. 253, 6111-6118

ELION, G.B., S.W. CALLAHAN, G.H. HITCHINGS et al., 1962

Experimental clin. and metabolic studies of thiopurines
Cancer Chemother. Rep. 16, 197-202

ELLIOT, H.W., 1975

Glutaminsynthesis in: Methods in Enzymology,

S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), 2, 337-342

ENGELS, K., 1970

Biochemical studies on the embryotoxic action of cyclophosphamide in: Metabolic pathways in mammalian embryos during organogenesis and its modification by drugs, Bass, Beck, Merker, Neubert, Randhahn (eds.) 123-127

ESKOLA, J. and P. TOIVANEN, 1974

Effect of in ovo treatment with cyclophosphamide on lymphoid system in chicken
Cellular Immunology 13, 459-471

FEATHERSTON, W.R. and R.W. SCHOLZ, 1968

Changes in liver xanthine dehydrogenase and uric acid excretion in chicks during adaptation to a high protein diet
J. Nutr. 95, 393-398

FISHER, J.R., 1966

Patterns of nitrogen metabolism and excretion in some vertebrate embryos
in: Biochemistry of animal development,
R. Weber (ed.), 2, 413-434

FISHER, J.R., J.L. CURTIS and W.D. WOODWARD, 1967

Developmental changes and control of xanthine dehydrogenase in developing chicks
Develop. Biol. 15, 289-299

FISHER, J.R., T.A. STEWARD, J.M. WU, J.S. NICKELS and J.A. HIGH, 1976

Regulation of nitrogen catabolic enzymes in chick liver - effects of amino acids
Enzyme 21, 385-396

FONTANELLE, L.J. and J.F. HENDERSON, 1969

An enzymatic basis for the inability of erythrocytes to synthesize purine ribonucleotides de novo.
Biochim. Biophys. Acta 177, 175-176

- FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL, 1983
Pharmakologie und Toxikologie
Wissenschaftsverlag, Bibliograph. Institut
(Mannheim/Wien/Zürich) 330-331, 628-630
- FOX, I.H. and W.N. KELLEY, 1971
Phosphoribosylpyrophosphate in man: Biochemical and
clinical significance.
Ann. Intern. Med. 74, 424-433
- Fox, I.H., J.B. WYNGAARDEN and W.N. KELLEY, 1970
Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in
man
N. Engl. J. Med. 283, 1177-1181
- FREEMAN, B.M. and M.A. VINCE, 1974
Development of the avian Embryo
Chapman and Hall, London
- GEBHARDT, R. and D. MECKE, 1984
Glutamine metabolism in mammalian tissues
D. Häussinger and H. Sies (eds.)
Springer Verlag Berlin, 98-116
- GERSHOFF, S.N. and C.A. ELVEJEM, 1951
Studies of the biological effects of methionin
sulfoximine
J. Biol. Chem. 192, 569-574
- GREENE, M.L., W.Y. FUJIMOTO and J.E. SEEGMILLER, 1969
Urinary xanthine stones: a rare complication of
allopurinol therapy
N. Engl. J. Med. 280, 426-427
- HARTMAN, S.C., 1963
Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase
J. Biol. Chem. 238, 3024-3035

HENDERSON, J.F. and M.K.Y. KHOO, 1965

On the mechanism of feedback inhibition of purine biosynthesis de novo in ehrlich ascites tumor cells in vitro

J. Biol. Chem. 240, 3104-3047

HERROD, H.G., M. MYERS, K.S. SELF and M.D. COOPER, 1970

Suppression of IgM and IgG synthesis in young rabbits by 6-methylmercaptapurine treatment

J. Lab. Clin. Med. 76, 1-9

HITCHINGS, G.H., 1963

Summary of informal discussion on the role of the purine antagonists

Cancer Res. 23, 1218-1225

HITCHINGS, G.H., 1966

Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis

Ann. Rheum. Dis. 25, 601-607

KAMINSKI, Z.W. and M.M. Jezewska, 1981

Effect of NADH on hypoxanthine hydroxylation by native NAD⁺-dependant xanthine oxidoreductase of rat liver, and the possible biological role of this effect

Biochem. J. 200, 597-603

KATO, Y., 1960

Cellular regulatory mechanisms

Carnegie Inst. Washington, Yearbook 60, 397-399

KATUNUMA, N., Y. MATSUDA and Y. KURODA, 1970

Phylogenic aspects of different regulatory mechanisms of glutamine metabolism Georg Weber (ed.)

in: Advances in Enzyme Regulation 8, 73-81

KUSCHINSKY, G. und H. LÖLLMANN, 1981

Pharmakologie und Toxikologie

Thieme Verlag, Stuttgart, 363-365

LANGEN, P., 1968

Antimetaboliten des Nukleinsäurestoffwechsels

Akademie Verlag, Berlin, 137-139

LEE, P.C. and J.R. FISHER, 1971

Regulation of xanthine dehydrogenase levels in liver
and pancreas of the chick

Biochim. Biophys. Acta 237, 14-20

LEE, P.C., J.S. NICKELS and J.R. FISHER, 1973

Coordinate regulation of purine nucleoside phosphorylase
and xanthine dehydrogenase levels in chick liver

Arch. Biochem. Biophys. 158, 677-680

LE PAGE, G.A. and M. JONES, 1961

Purinethiols as feedback inhibitors of purine synthesis
in ascites tumor cells

Cancer Res. 21, 642-649

LEWIS, J.M. and S.C. HARTMAN, 1975

Amidophosphoribosyltransferase (chicken liver)

in: Methods in Enzymology 51, 171-178

LINNA, T.J., D. FROMMEL and R.A. GOOD, 1972

Effects of early cyclophosphamide treatment on the
development of lymphoid organs and immunological
functions in the chickens

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 42, 20-39

LIPMANN, F. and L.C. TUTTLE, 1945

A specific micromethod for the determination of acyl
phosphates

J. Biol. Chem. 159, 21-28

- LITWACK G., J.N. WILLIAMS, P.FEIGELSON and C.A.ELVEJEM, 1950
Xanthine oxidase and liver nitrogen variation with
dietary protein
J. Biol. Chem. 187, 605-611
- LONSDALE, K. and D.J. SUTOR, 1971
Uric acid dihydrate in bird urine
Science, N.Y. 172, 958-959
- LORZ, D.C. and G.H. HITCHINGS, 1950
Specificity of xanthine oxidase
Fed. Proc. 9, 197
- MC COLLISTER, R.J., W.R. GILBERT and J.B. WYNGAARDEN, 1962
Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by
6-mercaptapurine and other purine analogues
J. Clin. Invest. 41, 1383
- MC COLLISTER, R.J., W.R. GILBERT, D.M. ASHTON and
J.B. WYNGAARDEN, 1964
Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mer-
captapurine ribonucleotide and other purine analogues
J. Biol. Chem. 239, 1560-1563
- MC CORD, J.M., 1985
Oxygen derived free radicals in postischemic tissue
injury
N. Engl. J. Med. 312, 159-163
- MC NABB, R.A., A.F.M. MC NABB and A.P. HINTON, 1973
The excretion of urate and cationic electrolytes by the
kidney of the male domestic fowl (gallus domesticus)
J. Comp. Physiol. 82, 47-57
- MC NABB, R.A. and A.F.M. MC NABB, 1975
Urate excretion by the avian kidney
Comp. Biochem. Physiol. 51A, 253-258

MEISTER, A., 1985

Glutamine synthetase from mammalian tissues
in: Methods in Enzymology, 113, S.P. Colowick,
N.O. Kaplan (eds.), 185-199

MEYLER, L. and A. HERXHEIMER, 1972

Side effects of drugs 6,
Verlag Excerpta Medica, Amsterdam

MORELL, D.B., 1955a

Xanthine dehydrogenase of chicken liver
Biochim. Biophys. Acta 16, 258-262

MORELL, D.B., 1955b

Xanthine dehydrogenase of chicken liver
Biochim. Biophys. Acta 18, 221-225

MORGAN, E.J., 1930

Xanthine oxidase in the avian embryo
Biochem. J. 24, 410-414

MURISON, G., 1969

Synthesis and degradation of xanthine dehydrogenase
during chick liver development
Develop. Biol. 20, 518-543

MURRAY, A.W., 1966

The effect of 6-mercaptopurine on the total acid
soluble and nucleic acid adenine and guanine
nucleotides of ehrlich ascites tumour cells
Biochim. Biophys. Acta 123, 428-429

NEEDHAM, J., 1926a

The energy-sources in ontogenesis. II. The uric acid
content and the general protein metabolism of the deve-
loping avian egg
J. exp. Biol. 4, 114-144

NEEDHAM, J., 1926b

The energy-sources in ontogenesis. III. The ammonia content of the developing avian egg and the theory of recapitulation

J. exp. Biol. 4, 145-154

NEEDHAM, J., 1931

Chemical Embryology, 3 vols.

Cambridge, University Press

NIERLICH, D.P. and B. MAGASANIK, 1965

Regulation of purine ribonucleotide synthesis by end product inhibition

J. Biol. Chem. 240, 358-365

OKUMURA, J. and I. TASAKI, 1968

Urinary nitrogen excretion in fowls fed acid or alkali

J. Nutr. 95, 148-152

PATTEN, B.M., 1948

The early embryology of the chick

The Blakiston Company, Philadelphia-Toronto, 137-139

POMALES, R., S. BIEBER and R. FRIEDMAN, 1963

Augmentation of hypoxanthine into nucleic acids by the administration of xanthine oxidase

Biochim. Biophys. Acta 72, 119-120

POMALES, R., G.B. ELION and G.H. HITCHINGS, 1965

Xanthine as a precursor of nucleic acid purines in the mouse

Biochim. Biophys. Acta 95, 505-506

PRAJDA, N., H.P. MORRIS and G. WEBER, 1979

Glutamine-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (amidophosphoribosyltransferase, EC 2.4.2.14). Activity in normal, differentiating and neoplastic kidney

Cancer Res. 39, 3909-3914

PRUY, J., 1982

Die Aktivität der Xanthindehydrogenase und ihr Einfluss
auf die Harnsäurebildung in der embryonalen Kükenleber.
Diss. München 1982, 19-26

ROMANOFF, A.L., 1967

Biochemistry of the avian embryo
Wiley (ed.), New York, 156-167

ROWE, P.B. and J.B. WYNGAARDEN, 1966

The mechanism of dietary alterations in rat hepatic
xanthine oxidase levels
J. Biol. Chem. 241, 5571-5576

ROWE, P.B. and J.B. WYNGAARDEN, 1968

Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase
J. Biol. Chem. 243, 6373-6383

RUNDLES, R.W., 1985

The development of allopurinol
Archives of Internal Medicine, 145, 1492-1503

RUNDLES, R.W., J.B. WYNGAARDEN and G.H. HITCHINGS, 1963

Effects of a xanthine oxidase inhibitor on thiopurine
metabolism, hyperuricemia and gout
Trans. Assoc. Am. Physicians 76, 126-140

SALSER, J.S. and M.E. BALIS, 1965

The mechanism of action of 6-mercaptopurine
Cancer Res. 25, 539-544

SCHOLZ, R.W. and W.R. FEATHERSTON, 1968

Effect of alterations in protein intake on liver
xanthine dehydrogenase in the chick
J. Nutr. 95, 271-277

SCHUNACK, W., K. MAYER und M. HAAKE, 1981

Arzneistoffe

Vieweg-Verlag, Braunschweig, 546-551

SEYANA, S., Y. KURODA and N. KATUNUMA, 1972

Purification and comparison of glutamine synthetase
from rat and chick livers

J. Biochem. (Tokyo) 72, 1017-1027

STARZL, T.E., C.W. PUTMAN, C.G. HALGRIMSON, G.T. SCHROTER,
G. MARTINEAU, B. LAUNOIS, J.L. CORMAN, I. PENN, A.S. BOOTH,
C.G. GROTH and K.A. PORTER, 1971

Cyclophosphamide and whole organ transplantation in
human beings

Surg. Gynec. Obstet. 133, 981-991

STIRPE, F. and E. DELLA CORTE, 1965

Regulation of xanthine dehydrogenase in chick liver.
Effect of starvation and of administration of purines
and purine nucleosides.

Biochem. J. 94, 309-313

STIRPE, F. and E. DELLA CORTE, 1969

The regulation of rat liver xanthine oxidase

J. Biol. Chem. 244, 3855-3863

STRITTMATTER, C.F., 1965

Studies on avian xanthin dehydrogenase, properties and
patterns of appearance during development

J. Biol. Chem. 240, 2557-2564

TASAKI, I. and J. OKUMURA, 1964

Effect of protein level of diet on nitrogen excretion
in fowls

J. Nutr. 83, 34-38

- TURK, J.L. and L.W. POULTER, 1972
Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide
Clin. Exp. Immunol. 10, 285-296
- VAN PILSUM, J.F., J.F. SPEYER and L.T. SAMUELS, 1957
Essential amino acid deficiency and enzyme activity.
Arch. Biochem. Biophys. 68, 42-52
- VINCENT, M.-F., G. VON DEN BERGHE and H.-G. HERS, 1984
Metabolism of hypoxanthine in isolated rat hepatocytes
Biochem. J. 222, 145-155
- VORHABEN, J.E. and J.W. CAMPBELL, 1972
Glutamine synthetase, a mitochondrial enzyme in uricotelic species
J. Biol. Chem. 247, 2763-2767
- VORHABEN, J.E. and J.W. CAMPBELL, 1977
Submitochondrial localization and function of enzymes of glutamine metabolism in avian liver
J. Cell. Biol. 73, 300-310
- WARING, M.J., 1981
DNA-modification and cancer
Ann. Rev. Biochem. 50, 159-192
- WASLIEN, C.I., D.H. CALLOWAY and S. MORGEN, 1968
Uric acid production of men fed graded amounts of egg protein and yeast nucleic acid
Amer. J. Clin. Nutr. 21, 892-897
- WAUD, W.R. and K.V. RAJAGOPALAN, 1976
Purification and properties of the NAD^+ -dependant (Type D) and O_2 -dependant (Type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase
Arch. Biochem. Biophys. 172, 354-364

WILSON, R.R., A.A. LETTER and R.A. BLOMFIELD, 1969

The protective effect of some sodium compounds against ammonia intoxication in the avian species
Comp. Biochem. Physiol. 29, 653-658

WITTMANN, J. and H. Pruy, 1983

Activation of xanthine dehydrogenase during the prenatal period through L-thyroxine, thiourea and cycloheximide
Cell Differ. 13, 77-83

WITTMANN, J., A. MENGI and M. GOLDBERG, 1986

Activation of hepatic and inactivation of renal xanthine dehydrogenase activity by dexamethasone during the prenatal period in chick eggs
Enzyme 35, 70-76

WOODWARD, W.D., P.C. LEE, N.W. DE LAPP and J.R. FISHER, 1972

Induction of chick liver xanthine dehydrogenase by purines
Arch. Biochem. Biophys. 153, 537-542

WOODWARD, W.D., T.G. ALLRED, J.S. NICKELS, J.M. WU and J.R. FISHER, 1975

Regulation of some nitrogen catabolizing enzyme levels in chick liver
Arch. Biochem. Biophys. 169, 134-139

WYNGAARDEN, J.B., 1970

Allopurinol and xanthine nephropathy
N. Engl. J. Med. 283, 371-372

WYNGAARDEN, J.B. and D.M. ASHTON, 1959

The regulation of activity of phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by purine ribonucleotides: A potential feedback control of purine biosynthesis
J. Biol. Chem. 234, 1492-1496

WYNGAARDEN, J.B. and E.W. HOLMES Jr., 1977

Molecular nature of enzyme regulation in purine biosynthesis

Purine and Pyrimidine Metabolism, a Ciba Foundation Symposium 48 (new series), 43-59

YOUNATHAN, E.S., E. FRIEDEN and K. DITTMER, 1956

Sensitivity of rat liver xanthine oxidase to amino acid analogues

J. Biol. Chem. 219, 531-537

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit wertvolle Anregungen und Hinweise gaben.

Mein besonderer Dank gilt dem geschäftsführenden Vorstand des Instituts, Herrn Prof. Dr. H. Zucker für die Überlassung des Arbeitsplatzes und Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. Josef Wittmann für die Überlassung des Themas.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau B. Hofer, Herrn Dr. Goldberg und den anderen Doktoranden des Instituts.

LEBENS LAUF

15. März 1961	Geboren in Nürnberg als erstes von drei Kindern der Landwirtseheleute Emilie und Georg Krauß.
1967 - 1971	Besuch der Grundschule in Winkelhaid.
1971 - 1980	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Leibniz-Gymnasiums in Altdorf.
1980	Abitur
Juli 1980	Grundwehrdienst bis zur Ausmusterung.
1980 - 1985	Studium der Veterinärmedizin an der tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
Nov. 1985	Staatsexamen
Feb. 1986	Approbation
seit 1983	Doktorand am physiologischen Institut der tiermedizinischen Fakultät.

